

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Interes epidemiológico de los estafilococos en productos
alimenticios**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Modesto Torres Ullauri

Madrid, 2015

R 315981

UNIVERSIDAD CENTRAL DE MADRID

DEC 14.31
TOR

FACULTAD DE MEDICINA



BIBLIOTECA U.C.M.



5307290477

INTERES EPIDEMIOLOGICO DE LOS ESTAFILOCOCOS

EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS



DIRECTOR: PROFESOR DR. D. VALENTIN MATILLA GOMEZ

AUTOR: MODESTO TORRES ULLAURI

CURSO: 1968 - 69

El presente trabajo fue presentado como tesis doctoral del autor el 27 de marzo de 1969 ante el tribunal formado por los profesores: Matilla Gómez, Fernandez Cruz, Armijo Valenzuela, Piedrola Gil y Gil Gallarre, obteniendo la calificación de Sobresaliente "Cum Laude".

INTERES EPIDEMIOLOGICO DE LOS ESTAFILOCOCOS

EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS

A MIS PADRES

Y

A MARIA ISABEL

I N T R O D U C C I O N

Y

A G R A D E C I M I E N T O

I N T R O D U C C I O N

Dentro del amplio margen que a la investigación ofrece el *Staphylococcus Rosenbach*, el de más reciente actualidad es sin duda el estudio de su enterotoxina, verdadero agente causal de la toxiinfección por estafilococo. La enterotoxina estafilocócica que según NAI produce el setenta por ciento de las toxiinfecciones alimenticias, es en los Estados Unidos considerada la intoxicación más frecuente de las producidas por alimentos. En España se sospecha que este tipo de intoxicación sea también frecuente y concretamente en Madrid-Capital; que al acelerar su progreso y ritmo de vida, empieza a asimilar costumbres y hábitos alimenticios de moda en otras grandes capitales. Así vemos como cada día es mayor el número de personas que comen fuera de casa en establecimientos públicos, alimentos preparados o semi-preparados, que hace que cualquier brote de intoxicación de este tipo, abarque rápidamente a gran número de personas. Las estadísticas sobre este tipo de intoxicación tienen solo un valor relati-

vo, ya que la mayoría de los casos aislados, curan sin la intervención del médico y son solo las intoxicaciones en comunidades las que requieren la atención de los funcionarios de la Salud Pública. Los brotes aislados de intoxicación por alimentos que recoge la prensa diaria, son los que nos ponen sobre la pista de este problema. Veamos algunos de los más recientes: El diario "YA" del 19 de marzo del presente año, publica en sus páginas - "Más de once toneladas de alimentos han sido declarados no aptas para el consumo". El ABC del 6 de abril de este mismo año comunica que, por decisión de la Comisión Delegada de Sanidad de Servicios Técnicos de Madrid, la carne picada solo podrá venderse en saquitos de plástico cerrados al vacío y conservados en frigoríficos. Posteriormente este mismo diario, el 4 de julio del año en curso, publica, "Cien intoxicados en un restaurante de la Gran Vía durante la celebración de un banquete de bodas". La importancia creciente de este tipo de problema, más el hecho de que su contenido científico se halla aún en plena formación, fueron las razones principales que nos animó a investigar hasta que punto los estafilococos enterotóxicos

tienen una relación causal en ellas, ya que como sabemos, las intoxicaciones por alimentos a que está expuesto el hombre, guardan estrecha relación con una serie de variados factores, entre los que destacan, los hábitos alimenticios, las condiciones higiénico-sanitarias y los factores climáticos.

Nuestro estudio se centra en la investigación de los estafilococos patógenos con capacidad para producir enterotoxina en alimentos como: carne picada, embutidos de todas las clases y fiambres, de los que se venden directamente al público en los distintos tipos de establecimientos de los doce distritos en que está oficialmente dividida Madrid-Capital. Hemos decidido estudiar estos alimentos, por ser los que con mayor frecuencia están comprometidos en este tipo de toxiinfección, porque su materia prima, la carne, está cometida a un gran número de manipulaciones durante su preparación y venta y porque estudios de este tipo en Madrid, aun no se han realizado. Con nuestra investigación hecha por distritos, pretendemos también ver que relación existe entre el grado de con-

taminación de estos alimentos y la categoría social del distrito, y relacionarlo dentro de lo posible, a la frecuencia de su presentación clínica; establecer el origen más frecuente de esta contaminación y dar una pauta para su profilaxis, si esto es posible.

El presente trabajo comprende una primera parte en la que se describen las características más importantes del germen que estudiamos, su enterotoxina y los antecedentes del problema; en la segunda parte, se describen los medios de cultivo, técnicas analíticas y animales de experimentación empleados; en la tercera parte, hacemos una breve revisión del proceso de elaboración usual para este tipo de alimentos y las posibles fuentes de contaminación; en la cuarta parte damos los resultados encontrados y las conclusiones a que hemos podido llegar y en un último capítulo la bibliografía y otras fuentes de información.

A G R A D E C I M I E N T O

Después de exponer el objeto y motivo del presente trabajo, quiero manifestar aquí mi incondicional gratitud al Profesor Don Valentín Matilla Gómez, Director de esta tesis, por permitirme realizarla bajo su dirección, por la orientación científica y facilidades técnicas de él recibidas.

Al Doctor Don Francisco Vasallo Matilla, Profesor Adjunto de la Cátedra de Microbiología, por el estímulo, asesoramiento constante, orientación teórica y la enseñanza práctica que siempre me dispensó, y a todo el personal de la cátedra que de una forma u otra me ayudaron y demostraron siempre un buen espíritu de cooperación, para todos ellos, mi impederera gratitud.

GENERALIDADES

DEL

ESTAFILOCOCCO AUREUS

Y SU

ENTEROTOXINA

HISTORIA

KOCH en 1878 los vió por primera vez en las secreciones supuradas de algunos de sus enfermos. PASTEUR en 1880 los cultivó en medios líquidos. OGSTON en 1881 señaló su presencia constante en abscesos agudos y crónicos y propuso que se le diera el nombre de estafilococos a este tipo de germen. ROSENBACH en 1884 hizo un estudio completo de ellos, los obtuvo en cultivos puros, acepta y difunde el nombre de estafilococo y los divide en dos especies: *Staphylococcus piógenos aureus*, y *Staphylococcus piógenos albus*. PASSET en 1885 descubre una nueva especie de *Staphylococo piógeno* y la llama *citreus*.

DEFINICION

Los estafilococos son células de forma redonda u ovalada, inmóviles, que en los medios de cultivo se multiplican y agrupan en acúmulos irregulares, como "racimos de uva".

Enturbian homogéneamente los medios líquidos, y puede observarse formando cadenas cortas, parejas, o pequeños grupos. En las placas de agar, dan un crecimiento opaco, colonias grandes de color amarillo-dorado, amarillo-limón, o blanco, según la especie. Se encuentran en todas partes y son la causa más frecuente de supuraciones localizadas. Son catalasa-positivos, y oxidasa-negativos, entre otras características bioquímicas. La especie tipo, es el estafilococo aureus de ROSENBACH. No obstante son algo enigmáticos y menos conocidos que la mayor parte de las bacterias.

CLASIFICACION

Desde los trabajos de ROSENBACH en 1884 hasta los trabajos de MOSEL en 1962, se ha venido considerando como tres las especies en que puede dividirse el género *Staphylococcus*: Aureus, Albus y Citreus. La producción de pigmento, que durante más de medio siglo sirvió como criterio de clasificación, es considerada actualmente insatisfactoria como base

de una clasificación taxonómica. ELEK considera que la pigmentogénesis debe ser abandonada como criterio de clasificación, a pesar de la veneración de que ha sido objeto por generaciones de célebres bacteriólogos.

WILSON y MILES, siguiendo este nuevo criterio reformista, proponen como base de una nueva clasificación, la producción de coagulasa. Así, consideran dos grupos de estafilococos: estafilococos coagulasa-positivos y estafilococos coagulasa-negativos. Los estafilococos coagulasa-positivos pueden dar origen a colonias: amarillo-oro o *Staphylococcus Aureus*, amarillo-pálido y blancas o incoloras. Los estafilococos coagulasa-negativos los denomina *Staphylococcus Albus* y estos en el 95% de los casos dan colonias blancas, solo el 3% da colonias amarillo-pálido y el 2% amarillo-oro. El término *Staphylococcus Citreus*, es poco usado, es una especie aun mal definida, de difícil diferenciación con el micrococo y produce un pigmento amarillo-verdoso.

TINCION

Los estafilococos se tiñen fácil e intensamente con los colorantes básicos usuales de tinción simple. Son grampositivos, aunque algunas veces son descritos como gramnegativos. La resistencia a la decoloración durante el proceso de tinción varía con las diversas especies de estafilococos y con la edad de la cepa. Así, muchas cepas que son grampositivas dentro de las primeras veinticuatro horas, se hacen luego gramnegativas a medida que el cultivo envejece. Para obtener un criterio uniforme de tinción, hemos tomado estas dos precauciones: Primero, utilizar cultivos jóvenes, de no más de veinticuatro horas. Segundo, no prolongar innecesariamente el proceso de decoloración. Con estas dos precauciones, todos nuestros estafilococos fueron grampositivos.

MORFOLOGIA

Los estafilococos son células redondas o ligeramente ovala-

das, cuyo diámetro oscila entre 0.8-1.0 micra. El tamaño de los estafilococos varía de una especie a otra y aún dentro de una misma especie ya que depende en parte de la edad del cultivo y de la composición química del medio en que crece. Son inmóviles, no flagelados y no esporulados. Su característica morfológica más notable es la tendencia a presentarse como masas irregulares de células, sin guardar ninguna configuración definida; esta agrupación informe es la consecuencia de su división celular en los tres planos del espacio, más la tendencia de sus células hijas a permanecer próximas entre si. Estas masas celulares tridimensionales se ven casi exclusivamente en las preparaciones en fresco. En los frotis teñidos, las masas celulares están aplanadas y dan el aspecto de láminas celulares irregulares.

Los estafilococos son descritos como que no poseen cápsulas, aunque LYONS, en 1937, asegura haber visto cápsulas en los estafilococos de sus cultivos en caldos de tres horas. Estas cápsulas desaparecían cuando el cultivo se hacía viejo. Otros investigadores, no han podido comprobar estas afirma-

ciones en estudios hechos con cultivos jóvenes de *Staphylococcus Aureus*. En la actualidad se acepta, que ciertas cepas mucoides, la presentan, pero de manera ocasional. PRICE y KNEELAND en 1954 y 1956 respectivamente, estudiaron detenidamente estas cepas mucoides, intentaron teñir su cápsula, y aunque esta no pudo ser teñida, dió una importante reacción capsular, aunque más debil, que la mayor parte de las cepas no-mucoides (estafilocócicas), lo que permitió suponer, que casi todas las cepas de *Staphylococcus Aureus* forman pequeñas cantidades de material capsular. SALL, MUDD y TAUBLER en 1961, describieron una pseudo-cápsula, que consideraron que era producida, por la acumulación extracelular de coagulasas.

La disposición típica en "racimos de uva" se observa con más frecuencia en los medios sólidos que en los líquidos, aunque en estos últimos, es más frecuente verlos formando parejas, cortas cadenas, o pequeños grupos.

Su diferencia en cuanto a su agrupación con el estreptococo,

a veces puede ser muy difícil o casi imposible si empleamos solo un medio, ya que los estreptococos en los medios sólidos, pierden su capacidad de formar cadenas y pueden formar grupos pequeños, y parejas similares a las del estafilococo. En cambio es fácil establecer la diferencia entre ellos, cuando empleamos ambos medios, sólidos y líquidos. Los puntos diferenciales más importantes son:

1. Las cadenas de estafilococos raramente contienen más de cuatro elementos.
2. La cadena, es la unidad fundamental del estreptococo.
3. Cuando el estreptococo se encuentra formando grupos, estos, generalmente están formados por la suma de cadenas.

METABOLISMO

Los estafilococos son microorganismos anaeróbicos facultativos, pero crecen mejor en presencia de oxígeno. Puestos en condiciones anaeróbicas, dan colonias planas, y no producen

ningún tipo de pigmento según lo demostró LUBINSKI en 1894. Las condiciones aeróbicas le permiten un crecimiento abundante, formación de colonias convexas y del pigmento dorado característico de la especie.

La temperatura a la que pueden crecer, varía dentro de un amplio margen, como lo es entre 12 y 45° C. Su crecimiento más rápido lo hacen a 37° C.

El pH óptimo para su crecimiento está entre 7.4-7.6, es decir, ligeramente alcalino, aunque muchas especies crecen bien, en un medio fuertemente ácido como es un pH de 4.0-5.0.

HUGHES en 1932 y más tarde KNIGHT en 1935, estudiando los requerimientos nutritivos del *Staphylococcus Aureus*, descubrieron que eran dos los factores esenciales para su crecimiento: el ácido nicotínico y la tiamina. GROSSOWICZ y BERGNER en 1943, demostraron la importancia del ácido nicotínico en el metabolismo glúcido del *Staphylococcus Aureus*. El papel

de la tiamina es de catalizador en el proceso de oxidación del ácido pirúvico. Los estafilococos pueden sintetizar riboflavina, según lo demostró O'KANE en 1941.

Los estafilococos no son de los más exigentes microorganismos en requerimientos nutritivos. Crecen fácilmente en medios que contengan extracto de carne y peptona, aunque su crecimiento se ve incrementado, cuando se usa agar-sangre.

FILDES en 1936, demostró que los estafilococos puestos en condiciones aeróbicas, podían crecer en medios completamente sintéticos, siempre que estos contengan: glucosa, cloruro sódico, 14-aminoácidos y las dos vitaminas bacterianas esenciales - ácido nicotínico y tiamina. Otros factores de crecimiento son: el calcio, potasio y magnesio. Al igual que las demás bacterias-parásitas, el estafilococo necesita azfre orgánico para su crecimiento, que lo obtiene del aminoácido, cistina. GLADSTONE en 1935, demostró que los estafilococos no crecían, cuando eran puestos en atmósferas privadas completamente de dióxido de carbono.

Aunque las necesidades nutritivas varían según las cepas, de una manera general podemos decir, que las cepas recién aisladas de *Staphylococcus Aureus* son exigentes en sus requerimientos nutritivos, esto hace que los medios puramente sintéticos requieran una gran cantidad de aminoácidos, fundamentalmente: cistina, leucina, prolina, valina, glicina, ácido aspártico, fenilalanina y arginina. Pero estas bacterias pueden "entrenarse" mediante pasos sucesivos por medios gradualmente más sencillos, para que crezcan en ausencia de todos o la mayor parte de los aminoácidos que fueron necesarios para el crecimiento de la cepa original.

EVANS en 1948, hizo notar que los estafilococos coagulasa-positivos, eran capaces de crecer en un medio sintético privado de biotina, mientras que los coagulasa-negativos no lo hacían.

Los cultivos viejos de *Staphylococcus Aureus* y el *Staphylococcus Albus* son gradualmente menos exigentes en sus requerimientos nutritivos.

PRODUCCION DE PIGMENTO

Aunque la formación de pigmento es una característica variable, usada durante años y actualmente desechada como base de su clasificación, tiene importancia práctica por estar siempre presente en los cultivos puros primarios. En general podemos decir que los estafilococos son buenos productores de pigmento. Así, los estafilococos coagulasa-positivos o *Staphylococcus Aureus* pueden producir pigmento: amarillo-oro o amarillo-pálido y a veces blanco. Los coagulasa-negativos, o *Staphylococcus Albus*, producen mayormente pigmento blanco, menos frecuentemente amarillo-pálido y solo ocasionalmente amarillo-oro.

La temperatura óptima para la formación de pigmento es ligeramente inferior a la temperatura óptima de crecimiento, es decir, por debajo de 37° C. LUBINSKI en 1894, señaló que tanto el oxígeno como el dióxido de carbono eran elementos esenciales para su producción.

ABD-EL-MALEK y GIBSON en 1948, aconsejaron un agar que con tenga patata con el 33% de leche, como el mejor medio para estudiar la pigmentogénesis, ya que según lo demostró JOHNSON en 1956, el calcio es esencial para su formación.

Sustancias tales como el monofosfato de glicerol y el monoacetato estimulan la pigmentación. Factores físicos como humedad, temperatura, y tensión de oxígeno influyen sobre la intensidad de la pigmentación; la calidad, guarda relación con la composición del medio y la longitud de onda de la luz que recibe el cultivo según lo demostrara STEUER en 1955. LUBINSKI en 1894, demostró que la capacidad de producir pigmento se pierde al hacer subcultivos en caldos y man tenerlos por tiempo prolongado, o al hacer subcultivos en condiciones de anaerobiosis.

REACCIONES BIOQUIMICAS

La actividad bioquímica de los estafilococos es muy diversa,

varía de una cepa a otra y no permite hacer una clara diferenciación entre el estafilococo y otras cocáceas. De ahí que muchos autores piensen que la fermentación de los azúcares usuales y alcoholes polihídricos carecen de importancia diferencial.

De todas las características bioquímicas, la fermentación del mannitol es sin duda la más importante. EVANS en 1948, demostró la estrecha relación que existe entre la fermentación aeróbica del mannitol y la producción de coagulasa. Actualmente se considera que solo los estafilococos coagulasa-positivos lo fermentan.

Practicamente todos los estafilococos son rojo-metilo y VOGES PROSKAUER positivos, aunque las cepas coagulasa-negativas produzcan una reacción más bien lenta, débil y tardía.

Todos son catalasa-positivos, salvo raras excepciones. Oxidasa-negativos. Indol-negativos. Todos los estafilococos fermentan los siguientes azúcares: lactosa, sacarosa, mal-

tosa, glicerol, manosa, fructosa, y eritrol. Los estafilococos no fermentan: el Inositol, Dulcitol, L-Xilosa, Ramnosa, L-Arabinosa, Adonitol, D-Sorbitol, Celobiosa, Dextrina. La fermentación de la: Rafinosa, Inulina y Salicina es variable.

La mayor parte de las cepas de *Staphylococcus Aureus* y solo una pequeña proporción de los otros tipos de estafilococos, producen las siguientes reacciones:

1. Producen amoniaco a partir de la peptona y la arginina.
2. Hidrolizan la urea.
3. Reducen los nitratos a nitritos.
4. Producen gelatinasa.

Producen además una serie de enzimas lipolíticas y proteolíticas.

BACTERIOFAGOS

Estos agentes fueron descubiertos por TWORT en 1915. Son virus filtrables que parasitan a las células bacterianas. Están formados de una cabeza protéica que contiene ácido nucléico y una cola también protéica. Se sabe que cuando se produce una infección por fagos, se producen los siguientes fenómenos: Durante el primer momento, el bacteriófago inyecta su ácido nucléico en el interior de la célula bacteriana, dejando fuera su cubierta protéica. Luego, una de estas dos cosas pueden suceder:

- 1º La fase lítica o ciclo vegetativo del crecimiento fágico,
o
- 2º El establecimiento de un estado lisogénico.

Durante la fase lítica, el ácido nucléico inyectado es el material genético del fago y el que inicia la formación de las nuevas partículas fágicas que se producen durante los primeros treinta minutos y que estas a su vez pueden dar

cientos de nuevas partículas. La bacteria luego se rompe dejando en libertad a estos nuevos fagos.

Durante el estado lisogénico, la genoma (serie completa de factores hereditarios) del fago, se asocia con la genoma de la bacteria, dando lugar a un nuevo estado llamado pro-fago.

Los fagos que se multiplican exclusivamente por el ciclo lítico, se denominan fagos virulentos, y aquellos que llegan hasta la fase de profago, se llaman fagos moderados.

El descubrimiento que TWORT hizo en 1915, la llevó a cabo sobre un cultivo de estafilococos aislados de los linfáticos de ternera. Este observó que se producían unos curiosos cambios degenerativos, que inevitablemente le llamaron la atención. En las recientes décadas y gracias a los estudios iniciados por DELBRUCK, son hoy ampliamente conocidos y usados como modelo, para estudiar el comportamiento genético y otros experimentos sobre bacterias. Pero hay que reconocer que gracias a los trabajos de D'HERELLE publicados en sus tres

monografías, de 1921, 1926 y 1930, el mundo conoce hoy con lujo de detalles, todo lo relacionado al estudio de los bacteriófagos.

CLASIFICACION CON BACTERIOFAGOS

La aplicación de los fagos para clasificar a los estafilococos se debe en gran parte a los trabajos de BLAIR. Su empleo es útil, cuando los métodos bioquímicos y serológicos corrientes fracasan.

BURNET y LUSH en 1935, observaron como los bacteriófagos se comportaban de manera distinta frente a diferentes cepas de estafilococos. Ellos señalaron ya la posibilidad de una subdivisión de estos gérmenes mediante el empleo de estos fagos. Así, en 1938, WILLIAMS y TIMMINS hicieron una primera clasificación empleando este método. Desde ese entonces se han ido descubriendo diferentes lisotipos, muchos de ellos relacionados entre si, lo que ha permitido establecer

cuatro grupos, con treinta y un fagos diferentes. Posteriormente se añadió el grupo M o grupo misceláneo, que comprende nueve fagos de difícil clasificación. A los fagos se los denominan con números arábigos, pero hay algunos que para diferenciarse se acompañan de una letra mayúscula.

No se poseen aún los datos suficientes para precisar con exactitud: la distribución de los diversos lisotipos según la procedencia del estafilococo, sus características bioquímicas o antigénicas y su resistencia a los antibióticos.

Aunque este método fué usado por primera vez con el bacilo tífico, su empleo es útil para estudios epidemiológicos del estafilococo, especialmente cuando la fuente de infección primaria es un portador humano.

Se ha dicho de la clasificación con fagos, que es poco práctica, ya que requiere poseer toda una gama de virus bacteriales. Para trabajos sistemáticos se recomienda emplear un mínimo de veintuno, que son los siguientes:

Grupo I: - 29; 52; 52A; 79; 80.

Grupo II: - 3A; 3B; 3C; 55; 71.

Grupo III: - 6 ; 7 ; 42E; 47; 53; 54; 75 y 77.

Grupo IV: - 42D.

Grupo M: - 81 y 187.

Su técnica es sencilla, consiste en inocular a la superficie de una placa que contenga agar nutriente con las cepas que se quieran tipar, cada miembro de los diferentes grupos de fagos. Después de un corto período de incubación se puede ver como el crecimiento bacteriano confluyente es interrumpido por zonas de lisis, producidas por los fagos que han atacado a esas cepas. Cuando la prueba es negativa, el crecimiento bacteriano se produce sin ninguna interrupción.

PRODUCCION DE TOXINAS

VAN DER VELDE y colaboradores en 1894, observaron como ciertas cepas de estafilococos puestas en condiciones adecuadas,

producían sustancias tóxicas. PARKER en 1924, trajo a la actualidad de entonces este problema. Estudiando el filtrado de estas sustancias tóxicas comprobó que producían: hemólisis; destrucción de leucocitos; que su inoculación intradérmica en conejos o cobayas producía necrosis y que cuando era inyectada en ratones, producía un cuadro toxémico de consecuencias fatales. BURNET en 1929 y GENGOU en 1932, estudiando nuevamente estas acciones, llegaron a la conclusión de que todos estos efectos eran producidos por una misma toxina. Aun en la actualidad, se discute si es una misma toxina con varias acciones o varias toxinas. Se sabe actualmente, y existe un acuerdo general sobre ello, de que el estafilococo produce varias sustancias tóxicas y gran número de enzimas, y que la formación de estas toxinas es una propiedad que solo la poseen las cepas patógenas del estafilococo, es decir, el *Staphylococcus Aureus*, principalmente.

Hoy se acepta que los estafilococos producen por lo menos, cuatro Lisinas o Estafilolisinas, además de: Leucocidina, Enterotoxina, Coagulasa, Fibrinolisisina, Hialuronidasa y

Desoxirribonucleasa.

ESTAFILOLISINAS

Actualmente se conocen las siguientes estafilolisinas:

alfa, beta, gamma, delta y épsilon.

Estafilolisina Alfa: Liza los hematíes del conejo y de ovejas, pero no tiene acción sobre las células humanas ni del caballo. Posee una fuerte acción letal, una débil acción dermonecrótica y una ligera acción similar a la leucocidina. Necesita para su producción de anhídrido carbónico, oxígeno e iones de magnesio o manganeso. Es inhibida por los agentes quelantes. Predomina en las cepas que son patógenas para el hombre y su formación está relacionada con la producción de coagulasa.

Estafilolisina Beta: Liza los hematíes de oveja, pero esta

acción se produce al ser sometidos a temperaturas de incubadora y de refrigerador respectivamente. Cuando los hematíes son incubados a 37° C, la lisis no se produce, salvo que se encuentre en concentraciones muy elevadas pero cuando el cultivo se enfría, o se somete a la temperatura del refrigerador, la lisis se produce.

Carece de actividad hemolítica frente a los hematíes de conejo, caballo y del hombre. Su actividad letal es escasa y no tiene acción dermonecrótica. Para su producción no requiere anhídrido carbónico, ni oxígeno, pero si, iones de magnesio o manganeso. Los agentes quelantes estimulan su actividad. La producen los estafilococos de origen animal.

Estafilolisina Delta: Fué descubierta por WILLIAMS y HARPER en 1947, quienes observaron que en una placa de agar sangre incubada en atmósfera con anhídrido carbónico, se producía hemolisis que no era evitada por las antitoxinas alfa ni beta. MARKS y BAUGHAN en 1950, confirmaron estos hallazgos

y demostraron que esta nueva lisina podía ser fácilmente identificada porque tiene la particularidad de producir la lisis de los hematíes lavados del hombre y del caballo a 37° C de temperatura. Esta lisina posee solo una ligera actividad dermonecrótica, leucocidal y letal. La mayor parte de sus cepas requieren para su producción, agar y oxígeno. Inmunologicamente es diferente de las dos lisinas anteriores. Es sin duda la de más amplia actividad hemolítica, lisa además, los hematíes del mono, rata, ratón, oveja y conejo. Su titulación máxima la alcanza en cultivos de 48 horas de incubación y no en los de 96 horas, como lo hacen las lisinas alfa y beta. Predomina en las cepas patógenas para el hombre y su formación está relacionada con la producción de coagulasa.

Estafilolisina Gamma: Descubierta en 1936 por MORGAN y GRAYDON. Es inmunologicamente diferente de las lisinas alfa, beta y delta, aunque muchas veces es confundida con la lisina alfa II. Su existencia es aún discutida.

Estafilolisina Epsilon: Tiene la particularidad de que solo la producen los estafilococos no-patógenos. Se sabe poco de ella. Su existencia es discutida.

El 95 por ciento de las cepas coagulasa-positivas producen estafilolisina alfa o delta. El 82 por ciento producen ambas formas. Las cepas patógenas de origen animal, las producen pero en un muy bajo porcentaje.

ENTEROTOXINA

DACK y colaboradores en 1930, demostraron que las intoxicaciones alimenticias se producen por ingerir cultivos de cepas de estafilococos que forman enterotoxina sin células. La formación de la enterotoxina es una propiedad completamente diferente de las otras que tiene el estafilococo. Solo la poseen ciertas cepas de estas bacterias coagulasa-positivas, pero no todas. Hasta el momento actual no hay ma-

nera de saber o identificar por métodos directos, cuales son las cepas enterotóxicas, lo sabemos, solo después de comprobar la formación de la toxina. Siguiendo la clasificación fágica, sabemos que muchas de las cepas enterotóxicas están comprendidas en los tipos 6; 47 y 42D, pero no todas las cepas de estos grupos son enterotóxicas.

DOLMAN y WILSON en 1938 y 1940 respectivamente, prepararon un medio de crecimiento que ellos consideran que es el mejor para la formación de la enterotoxina. Este consiste en un agar semisólido que después de sembrado requiere una incubación de cuarenta horas en una atmósfera del 10-30% de anhídrido carbónico.

Para estudiar su existencia y su poder patógeno, originalmente se emplearon voluntarios humanos y monos. DOLMAN y WILSON y COCKCROFT en 1936, comunicaron que era posible demostrar la presencia de la enterotoxina, si se destruía antes, sea por el calor, o por la formalina, o neutralizando con antisueros, las toxinas alfa y beta, ya que su inyección

intraperitoneal en gatitos producía vómitos y diarreas.

El animal de prueba debe pesar entre 350 y 700 gramos y lo que se inyecta es un filtrado de cultivo libre de células en cantidad de 1-3 mililitros. Si existe enterotoxina en este filtrado, después de media hora de la inyección, el animal experimenta vómitos paroxísticos de tipo proyectil, asociado con diarreas, seguido de una falta de estabilidad en sus pasos y un estado de laxitud y debilidad del que se repone completamente al cabo de varias horas.

Actualmente se discute sobre la especificidad de esta prueba. Para algunos no tiene valor y para otros es la única prueba de confianza. Así MATHESON y THATCHER en 1955, volvieron a estudiar este problema, re-examinando la inyección intraperitoneal en el gatito y terminaron por confirmar ampliamente los trabajos de DOLMAN y colaboradores.

Se ha sugerido otros métodos para demostrar la presencia de la enterotoxina tales como: inyección intravenosa en el conejo, en el mono, o la administración oral en gatitos.

SURGALLA, BERGDOLL y DACK en 1953, estimaron que los organismos más sensibles, son los voluntarios humanos, seguido por el *Macaccus Rhesus*, considerado como el mejor animal de experimentación. Ellos recomiendan aceptar el vómito como el único signo cierto de una reacción positiva cuando la prueba es dada por vía oral. Desafortunadamente, los monos son menos susceptibles a la enterotoxina que el hombre y se hacen tolerantes a ella muy facilmente. El chimpance es aparentemente más susceptible que el *Macaccus Rhesus* según lo demostró WILSON en 1959. Entre los humanos la sensibilidad es muy variable, solo unos pocos son aparentemente refractarios a la enterotoxina administrada por vía oral.

Actualmente se discute sobre su pretendida estabilidad frente al calor. La enterotoxina resiste la temperatura de ebullición durante quince o treinta minutos o más en un medio neutro, pero se destruye completamente en el autoclave.

El modo de acción de la enterotoxina no está del todo aclarado. Según los trabajos de BAYLISS en 1940 sobre gatos, y

de SHAUGHNESSY, REED y MICHAEL en 1942 sobre conejos, la acción de la enterotoxina es periférica y no central; actúa sobre la terminación de los nervios sensitivos o sobre el músculo liso del intestino delgado. Otros piensan que se trata de una neurotoxina, que se absorbe del intestino y que el vómito se produce por estímulo directo sobre el centro del vómito.

Hasta ahora, se conocen cuatro tipos inmunológicos de enterotoxina, denominados A,B,C y D y se sospecha que existan otros. Estas, son consideradas como proteínas puras cuyo peso molecular oscila entre 30.000 y 35.000 con escaso o ningún poder antigénico.

La enterotoxina A, es producida por la cepa 196E o ATCC 13565 del Staphylococcus Aureus. Es la más importante y la que produce mayor número de intoxicaciones. Fué purificada parcialmente por CASMAN en 1960. SCHANTZ y BERGDOLL la han obtenido recientemente en estado puro. Para su producción no requiere ninguna atmósfera especial, y su oxigenación

está determinada por el volumen del cultivo empleado.

CASMAN y BENNETT recomiendan el siguiente medio para su producción:

Su composición por litro es:

Citrato de hierro	25	miligramos
Fosfato monopotásico	1	gramo
Fosfato dipotásico	1	gramo
Sulfato de magnesio	0.2	gramos
l-Cistina	25	miligramos
Acetato sódico	7	gramos
l-Triptófano	75	miligramos
N-Z Amina A	20	gramos
Pantotenato cálcico	0.5	miligramos
Clorhidrato de tiamina	40	microgramos
Acido nicotínico	1.2	miligramos

El pH debe de ajustarse a 7.4.

La enterotoxina B, es producida por la cepa 243 o ATCC 14458 del *Staphylococcus Aureus*. Esta es la única cepa que la produce sin mezclas. DACK empleó originalmente la cepa 56 que posteriormente fué desechada porque la producía mezclada con pequeñas cantidades de enterotoxina A, aunque su rendimiento era superior a la cepa 243. Fué la primera enterotoxina obtenida en estado puro, y es la que se encuentra con menos frecuencia en los casos de intoxicación humana. Químicamente está formada por una cadena única de polipéptidos en la que predominan la lisina y el ácido aspártico. SURGALLA y colaboradores recomiendan para su producción el siguiente medio:

Su composición por litro es:

Caseina hidrolizada	15.	gramos
Acido nicotínico	1.23	miligramos
Clorhidrato de tiamina	50.	microgramos
Glucosa	2.25	gramos

Requiere ajustar el pH a 7.6 antes de esterilizar en el autoclave.

WAGMAN y colaboradores en 1965, estudiaron las propiedades físicas de la enterotoxina B y según estos autores, el punto isoiónico de esta enterotoxina, requiere un pH de 8.55 y un punto isoeléctrico con un pH de 8.6.

En cuanto se refiere a la enterotoxina C y D, hasta el momento presente no ha sido posible identificar las cepas del estafilococo productoras de ellas. BERGDOLL en 1965, aconsejó el siguiente medio para la producción de la enterotoxina C:

Su composición por litro es:

N-Z amina NAK	30	gramos
Hidrolizado de proteína en polvo .	30	gramos
Niacina	10	miligramos
Tiamina	5	miligramos
Agua destilada	1000	mililitros
Ajustar el pH a 7.6.		

Hasta el momento presente existe poca información sobre las propiedades físico-químicas de las enterotoxinas C y D.

PRODUCCION DE COAGULASA

LOEB en 1904, fué el primero que descubrió esta propiedad que tienen ciertas cepas de estafilococos de coagular el plasma. Posteriormente sus experiencias fueron confirmadas por MUCH en 1908. Desde entonces, este fenómeno ha sido objeto de amplios y profundos estudios. Muchas técnicas se han empleado para estudiar esta propiedad, pero probablemente la mejor sea la descrita por FISK en 1940. Los mejores resultados se obtienen con plasma humano o de conejo, citratado, oxalatado o heparinizado. Existen dos maneras de investigar esta propiedad. Una, la llamada prueba del tubo o prueba de coagulación, la otra prueba se hace sobre el portaobjetos, o prueba de aglutinación.

La prueba del tubo o de coagulación, requiere caldo cultivado fresco, máximo de una noche de incubación. Se emplea un mililitro de este caldo que se mezcla con un mililitro de plasma diluido al 1/10 en solución salina. La mezcla se incuba a 37° C por un tiempo de tres a seis horas; si durante este tiempo no aparecen coágulos se debe dejar a la temperatura ambiente durante toda una noche y volver a examinar los resultados. Es aconsejable emplear tubos testigos, pudiendo estos contener o solamente plasma, o plasma inoculado con estafilococos coagulasa-negativos, etc. Se debe tener la precaución de no emplear medios que contengan carbohidratos fermentables o mertiolato. MUCH en 1908, observó que los estafilococos que coagulaban el plasma eran también aglutinados por él mismo.

La prueba sobre el portaobjeto o prueba de aglutinación, consiste en mezclar sobre este, una gota de plasma y otra del caldo cultivado fresco, produciéndose la formación de grumos visibles a simple vista cuando la prueba es positiva.

Está demostrado que en la coagulación del plasma se producen dos fenómenos. En primer lugar, reaccionan por parte de la bacteria, una sustancia que esta produce y que se conoce con el nombre de procoagulasa. Por parte del plasma, un co-factor o activador plásmático que está presente siempre o casi siempre en el plasma. De esta interacción se produce o forma la coagulasa que es el verdadero agente coagulante. Es en la segunda fase, cuando se produce la coagulación del plasma, por la acción de esta coagulasa.

Como se ve y en sentido estricto, lo que las bacterias producen es la pro-coagulasa, pero que comunmente se la llama coagulasa.

El co-factor o activador plasmático tiene mucha similitud con la protrombina, pero es posible separarlo de este por filtración con filtros de SEITZ que retienen la protrombina. Este factor plasmático se encuentra irregularmente distribuido en las diferentes especies animales, esto explica el comportamiento de los plasmas ante la prueba de la coagu-

lasa. Así, vemos como las estafilocoagulasas coagulan el plasma humano, de conejo y de caballo, pero no el de rata, ratón o cobayo.

La presencia en la sangre del co-factor plasmático, guarda relación con la suceptibilidad de los animales a las infecciones por estafilococos, así por ejemplo: la rata, el ratón y el cobayo que carecen de él, o lo poseen en mínimas proporciones, son relativamente resistentes a este tipo de infección según pruebas experimentales hechas con estafilococos coagulasa-positivos.

Estudios recientes han puesto en evidencia que existen dos tipos de coagulasa. Una, que está unida a la célula, o coagulasa conjugada, y otra denominada coagulasa-libre, o no-conjugada.

La coagulasa conjugada o unida a la célula es la que interviene en la prueba de aglutinación sobre el portaobjeto.

La coagulasa libre es la que interviene en la prueba de coa

gulación o prueba del tubo y puede obtenerse en forma pura por precipitación salina y fragmentación posterior con etanol según lo demostró BLOBEL y TAGER. Es de naturaleza proteica y como consecuencia las enzimas proteolíticas la inactivan fácilmente. Es relativamente resistente al calor, solo se inactiva parcialmente con 100° C durante treinta minutos. Tiene escaso o ningún poder antigénico y según los estudios serológicos de DUTHIE, existen por lo menos cuatro grupos distintos, designados como A,B,C y D.

Se ha comprobado que el co-factor o activador plasmático no es necesario para la prueba de aglutinación sobre el portaobjeto, ya que ésta se produce en ausencia de este, pero en presencia del fibrinógeno y solo con organismos lavados. Esto explica el comportamiento de algunos plasmas como el del ratón, refractario a la prueba del tubo, pero que da buenos resultados con la prueba de aglutinación sobre el portaobjetos.

La prueba de aglutinación, tiene a su vez la ventaja que per

mite emplear el plasma tratado con merthiolate, cuyo uso está contraindicado para hacer con él la prueba de coagulación en el tubo. La prueba de aglutinación, es útil para estudios rápidos y de gran escala y teniendo en cuenta ciertas precauciones, se puede identificar hasta el 88% de los estafilococos coagulasa-positivos, sin falsas reacciones positivas.

EKSTED y NUNGESTER en 1955, demostraron que la coagulasa inhibe de manera importante el poder bactericida del suero normal para los estafilococos y aunque se desconoce el mecanismo, se sabe que no actúa sobre el metabolismo respiratorio de las células.

La producción de coagulasa parece ser exclusiva del *Staphylococcus Aureus*, aunque ocasionalmente también la pueden producir otras bacterias tales como: *Pseudomonas Aeruginosa*; *Serratia Marcescens*; *Escherichia Coli*; y *Bacillus Subtillis*; y algunas cepas de *Actinomyces* y la *Pasteurella Pestis*.

PATOGENICIDAD

Desde el punto de vista de la patogenicidad, los estafilococos han sido divididos en patógenos y no-patógenos, clasificación ésta que ha sido bien acogida. El principal representante del grupo patógeno es el *Staphylococcus Aureus*. Este produce un gran número de sustancias tóxicas y además de ser patógeno para el hombre, lo es para el conejo, y en menor proporción para el ratón, y el cobayo. Los no-patógenos llamados también *Staphylococcus Albus*, engloban todos aquellos estafilococos que no producen toxinas y que son inócuos para los animales antes mencionados.

En el hombre el estafilococo dorado se encuentra alojado en los orificios anteriores de la nariz, en casi el 50% de la población humana, pero las lesiones que el produce son con mucho, menos frecuentes. La mayoría de las veces, produce lesiones cutáneas tales como inflamación del aparato pilo-sebaceo, con formación de pus, que se drena através

de la piel dejando su curación cicatriz. Otras veces, forma vesículas intra-epidérmicas que se rompen y luego curan sin dejar cicatriz. Se ha visto que también infectan heridas, producen osteomielitis, septicemia y solo raramente una forma especial de bronconeumonía de consecuencias fatales. El estafilococo penetra por la piel macroscópicamente intacta.

El Staphylococcus Albus, produce lesiones cutáneas ligeras como, pústulas de acné, abscesos puntiformes y otros estados supurados, menos importantes de la piel. Sin embargo no se duda y aunque raramente sucede, puede producir septicemia crónica, endocarditis bacteriana subaguda, sobretodo en personas con válvulas cardíacas enfermas, en los que aparece espontáneamente, o en aquellos que han sufrido una intervención cardíaca.

El Staphylococcus Aureus produce mastitis, en las vacas, ovejas y cabras. Septicemia, en el cordero. Artritis supurada, en pollos y otras aves domésticas.

INFECCION EXPERIMENTAL EN EL HOMBRE

Es histórico el original experimento realizado por GARRE en 1885, quien frotando estafilococos en la piel de su brazo, consiguió la formación de forúnculos. Posteriormente, ALMQUIST en 1891, se inoculó estafilococos extraídos de un caso de pénfigo neonatal, que le produjo vesículas de un centímetro de diámetro. Estas y otras experiencias hechas en voluntarios humanos, sirvieron para saber que para que un forúnculo se forme, se necesita por lo menos un millón de estos microorganismos. Aunque se ha conseguido producirlo con menor número, disminuyendo la defensa natural de la piel mediante la humedad.

ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

En España, existe relativamente pocos trabajos publicados sobre este tema y los que existen se deben en gran parte a investigadores veterinarios. Tampoco se ha podido aún determinar con exactitud el número de brotes epidémicos habidos hasta la presente. La benignidad y transitoriedad del cuadro clínico, más el desconocimiento por parte de las autoridades sanitarias, por no ser esta una enfermedad de declaración obligatoria, han sido las principales razones de la minusvalía científica.

Así vemos como es en el año 1945 en que se conocen los primeros casos y solo diez años más tarde, en 1955, L. SAIZ MORENO presenta el primer trabajo sobre este tema, titulado "Intoxicaciones Alimenticias Provocadas por Estafilococos", durante la V Reunión de Sanitarios Españoles.

En este mismo año, aparecen otros trabajos sobre este tipo de intoxicaciones, de los veterinarios BLANCO y OVEJERO, publicados en el "Libro-Homenaje" a D. CESAREO SANZ EGAÑA.

Esta escasez de divulgación científica puede atribuirse en parte a que en aquel entonces, todas las investigaciones epidemiológicas iniciadas cuando se producían intoxicaciones de origen alimenticio, se orientaban sistemáticamente, o bien, hacia las Salmonellas o al B. Botulinum y su toxina.

En 1958 SAIZ MORENO se dedica nuevamente a estudiar este problema, y hace ahora un estudio de algunos brotes acaecidos en la Provincia de Ciudad Real como consecuencia de la ingestión de: queso de cabra, queso Manchego, chicharros en aceite, agujas y sardinas en aceite. Resalta la importancia del aceite como protector del estafilococo frente a la esterilización y llama la atención sobre el papel decisivo de los componentes del medio y su influencia en el poder patógeno.

En 1959, VALLE publica un trabajo titulado "El Estafilococo y Sus Toxinas, Causantes de Intoxicaciones Alimenticias...".

En 1960 J. GALLEG0 CAPILLA, estudia "Tres Episodios de Intoxicación Alimenticia por Enterotoxina Estafilocócica",

ocurridos en Granada durante los meses estivales de mayo y junio. El primer brote, producido por la ingestión de pasteles de crema. El segundo, por la ingestión de ensaladilla, (en que las patatas fueron preparadas el día anterior y mantenidas a la temperatura ambiente más de veinticuatro horas). El tercero, por ingestión de mortadela, en un estudiante de Medicina (en la que, la mortadela había sido enviada en lata abierta, desde otra provincia estando tres días de viaje y expuesta a la temperatura ambiente). En todos confirma la presencia del estafilococo patógeno en los alimentos responsables.

En este mismo año (1960), se publica una Tesis Doctoral realizada en Salamanca por A. MELLADO POLO, sobre el "Estudio Microbiológico y Epidemiológico de la Familia Enterobacteriaceae, en los Productos Cárnicos". El autor investiga preferentemente la presencia de Salmonellas en Salchichas Blancas, y aunque sus resultados son referidos a los diversos tipos de esta familia, menciona la presencia de estafilococos patógenos en este tipo de alimento.

En 1964, se realiza otra Tesis Doctoral sobre el "Estudio Microbiológico y Epidemiológico de Estafilococos Patógenos en Fosas Nasales". El autor J.M. PECO MALAGON hace un estudio de investigación con diversos tipos de pacientes: enfermos del Sanatorio Antituberculoso, del Hospital Clínico de Granada, del personal médico, enfermeras y estudiantes de microbiología y de doscientos cincuenta manipuladores de alimentos. Encuentra en estos últimos el 16.2% de estafilococos patógenos en las fosas nasales.

En febrero de 1966 GOMEZ LUS y colaboradores presentan una comunicación en la Real Academia de Medicina de Zaragoza sobre un trabajo titulado: "Clasificación Serológica de los Estafilococos Patógenos. Su Importancia Epidemiológica", en la que resalta la importancia de determinar el fagotipo o serotipo cuando se quiere hacer un correcto conocimiento de las fuentes de contaminación. El autor estudia dos brotes de intoxicación alimenticia. Uno, en septiembre de 1965 en Tarazona por ingestión de queso fresco de cabra, en el que la fuente de infección era la elaboradora del queso, de cuya

rinofaringe se aislaron estafilococos patógenos del serotipo cfmmo, es decir, de la misma estructura antigénica que los aislados de las muestras de queso conseguidas. El otro, en marzo del mismo año en Zaragoza, por ingestión de tartas y pasteles que intoxican a varios centenares de personas. De las tartas se aisló estafilococos coagulasa-positivos y de las fosas nasales de los manipuladores, el mismo germen. La tipación fágica, demostró que el germen era de origen humano, con serotipo abeflo.

En junio de 1967 en Salamanca, J.A. GARCIA RODRIGUEZ hace un trabajo presentado como Tesis Doctoral sobre "Presencia de Estafilococos Patógenos Enterotóxicos en Alimentos Cárnicos y Lácteos de Primera Necesidad". El autor estudia doscientas muestras de salchichas frescas de todas las variedades y doscientas cincuenta muestras de leche. Encuentra una abundante cantidad de estafilococos en ambos tipos de alimentos. El germen más frecuente por él encontrado fué el *Staphylococcus Albus*; ciento cuarenta contaminaciones en las salchichas y ciento cincuenta y dos en la leche. No

encontró *Staphylococcus Aureus* en las salchichas y sí en la leche fresca, en número de cincuenta y uno.

La Casuística Internacional menciona a DENYS en 1894 como el primero en relacionar un cuadro tóxico por alimentos con el estafilococo, germen que hasta entonces venía siendo considerado como saprofita. Este brote tóxico se produjo por ingestión de carne de vaca muerta de fiebre puerperal. Entre los afectados hubo un muerto. Fué posible aislar estafilococos patógenos de la carne de res, y al hacer la autopsia de la víctima, se encontró este mismo tipo de germen, en el bazo del cadáver.

En 1907, OWEN comunica haber asistido a diecisiete individuos, que presentaban un cuadro tóxico gastro-intestinal y tenían como único antecedente sospechoso, el haber ingerido todos el mismo alimento, carne bovina desecada.

En 1914 BARBER, en Filipinas, aísla estafilococos patógenos de la leche de vaca que había originado una intoxicación

colectiva y emite por primera vez la hipótesis, de que este germen, posee la particularidad de que en determinadas circunstancias produce una toxina que tiene acción selectiva sobre el tracto gastro-intestinal.

En 1929, DACK y WIGGERS comunican haber atendido a ocho personas intoxicadas por haber consumido tarta con crema, de la que posteriormente aislaron estafilococos patógenos, comprobando luego su poder enterotóxico, con voluntarios humanos.

En 1930, RAMSEY y TRACEY aislan de leche de vaca aparentemente normal, *Staphylococcus Aureus*; esta había antes provocado un cuadro de gastroenteritis en todos aquellos que la consumieron. Inoculando luego un cultivo de este germen, al gato, ocasionó en éste, fuertes vómitos acompañado de diarrea mucosanguinolenta.

En este mismo año, (1930) JORDAN, en Chicago, inoculando a voluntarios humanos un cultivo fresco de estafilococos patógenos, aislados de un brote de Gastroenteritis, consiguió

reproducir en éstos, la misma sintomatología.

DACK, en 1930 comunica haber asistido varios casos de intoxicación estafilocócica, por ingestión de leche de vaca.

En 1935, BLACKMANN, consigue aislar estafilococos patógenos, de leche sospechosa de haber producido un caso de intoxicación mortal.

En 1938, FELSENFELD en Checoslovaquia, encuentra estafilococos patógenos en los vómitos y heces de un sujeto intoxicado por alimentos. Dando a ingerir filtrados del cultivo de este germen a voluntarios, consiguió reproducir el cuadro clínico.

MINETT, en 1938, aisló dieciocho cepas de estafilococos, de una muestra de leche de vaca aparentemente en buen estado, de los cuales solo uno fué enterotóxico.

En 1949, NATVIG, en Noruega, considera de origen estafilocó

cico el setenta y cinco por ciento de las intoxicaciones por alimentos, registrados ese año en su país.

ROSATI, también en 1949, después de analizar noventa muestras de leche de vaca, encontró que cincuenta y cuatro de estas estaban contaminadas con estafilococos patógenos Aureus.

Durante este mismo año, (1949), en Inglaterra, MILLAR y POWNALL, estudian siete brotes de toxi-infección por enterotoxina estafilocócica, ocurridos en Sheffield. El primer brote lo produjo el consumo de embutidos recién preparados con carne de pollo y de conejo. El portador en este caso fué uno de los dos hombres que fabricaron el embutido, que padecía de dermatitis en muñeca y brazo.

En 1950, CONYBEARE, también en Inglaterra considera que el 20% de las intoxicaciones alimenticias aparecidas en los últimos diez años, fueron de origen estafilocócico.

En 1951, ASDRUBAL en Italia, después de examinar sesenta muestras de carne de buey sacrificados de urgencia, encontró estafilococos en treinta muestras, de estas, diecisiete fueron patógenas, y luego solo una, resultó ser enterotóxico.

BESALER y PROJA estudiaron durante los años: 1955,56,57, las intoxicaciones e infecciones alimentarias, producidas en Italia, obteniendo los siguientes resultados:

- En 1955: Ocurrieron cinco mil ciento ochenta y tres casos, de los cuales, un cincuenta y cinco por ciento fueron de origen estafilocócico.
- En 1956: Dos mil novecientos cincuenta y dos casos, de los cuales, un 57.1% tuvieron etiología estafilocócica.
- En 1957: Tres mil doscientas cuarenta y seis casos, de los cuales, el cincuenta por ciento fueron por estafilococos.

En la bibliografía consultada, se comprueba que en la Gran Bretaña, Bélgica y Suiza, los casos de toxiinfecciones atribuibles al estafilococo enterotóxico, fué superior al veinte por ciento.

En Estados Unidos, las estadísticas son más alarmantes, pero también las investigaciones más numerosas. Esto hace que actualmente se considere a los Estados Unidos como el país donde más y mejor atención se presta a este problema. Así vemos como:

JENSEN, en 1940, afirma que el noventa por ciento de las intoxicaciones por alimentos por él estudiadas, fueron de origen estafilocócico.

DEPAY, en 1944 comunica que un "pudin" contaminado, ocasionó la intoxicación de cuatro mil hombres pertenecientes a la Armada Norteamericana.

SEELIGER, en este mismo año, (1944), confirma que del millón

M E T O D O S Y T E C N I C A S

de intoxicados por alimentos habidos en el país durante ese año, es el estafilococo el agente etiológico más importante.

FEIG y MILTON en 1945, 46 y 47 estudiaron novecientos veintiseis brotes que produjeron un total de cuarenta y siete mil ochocientos setenta y nueve intoxicados, encontrando el siguiente porcentaje de agentes etiológicos:

79.7%	debidas a Estafilococos
14.9%	por Salmonellas
6.9%	por Estreptococos
-----	el resto por Shigellas, Coli Aerogenes y Proteus Vulgaris.

OBTENCION DE MUESTRAS

En la obtención de muestras hemos puesto particular interés porque pensamos que una muestra refleja a escala reducida las características del universo del cual es extraída, y es la que nos va a permitir obtener conclusiones. Creemos que de la bondad de una muestra depende el resultado de la investigación, y de ahí que concediéramos especial importancia a esta primera fase.

Nuestro estudio de investigación lo hemos efectuado por distritos, tomando como pauta la división oficial de Madrid-Capital en doce distritos municipales. Hemos dedicado una semana a la recogida de muestras en cada distrito y el número de muestras recogidas en cada uno de estos ha sido de cuarenta, en las que se incluyen ocho muestras de carne picada, ocho de embutidos de carne (chorizo, salchichón, salchichas blancas y rojas, butifarra y sobrasada), ocho de embutidos de vísceras (salchichas de hígado), ocho de embutidos de sangre (morcillas) y ocho muestras de fiambre (mortadela y

jamón York); lo que supone seiscientos gramos de cada una de estas variedades y tres mil gramos en total por distrito, considerando que cada muestra era de setenta y cinco gramos aproximadamente.

La recogida la hacíamos diariamente de lunes a viernes, y cada día recogíamos una variedad diferente de un lugar de venta distinto dentro del mismo distrito. Nuestro período de recogidas de muestras nos tomó tres meses, durante los cuales prácticamente hemos recorrido todos o casi todos los mercados, supermercados, carnicerías y demás puestos de venta para estos tipos de alimentos, existentes en Madrid. La visita a cada uno de estos puestos de venta nos servía para tener una visión real de las condiciones higiénicas de los locales de venta, de sus expendedores y comprobar si las condiciones exigidas por el Código Sanitario Español se cumplían.

De cada sitio procedíamos a llenar un modelo de ficha como el siguiente:-

Número de Muestra: _____

Fecha: martes, 20 de febrero de 1968.

Alimento en estudio: salchichas madrileñas blancas
frescas, rellenas de carne cruda.

Lugar de compra: Distrito: Buenavista
Calle: Lagasca 13
Tipo de tienda: Carnicería

Aspecto del sitio de
venta: Iluminación: Artificial Abundante
Material de las paredes: lavable
Estado de limpieza: bueno

Impresión de los de-
pendientes: Edad: entre 24 y 40 años
Sexo: Masculino
Cuidado personal: Bueno
Aspecto personal: Saludable

Hora de la compra: 13 horas

Cantidad comprada: tres salchichas (120 gramos)

Caracteres organolépticos: normales

Papel usado como envoltura: blanco especial con membrete.

Con el fin de obtener datos oficiales, oír sus opiniones, y constatar el proceso de elaboración de estos alimentos, hemos visitado personalmente al Director del Matadero de Madrid, al Director del Laboratorio Municipal y Higiene y a una importante fábrica de embutidos aquí en Madrid-Capital.

Antes de proceder a describir los medios de cultivo, pautas analíticas y demás operaciones realizadas, debemos decir que todos los medios empleados por nosotros en este trabajo han sido medios deshidratados, adquiridos principalmente de la casa Digestive Ferments Company, (Difco) de Detroit, Michigan, U.S.A. y de la casa The Oxoid Division of Oxo Limited, London, England. Las razones por las que hemos creído conveniente utilizar este tipo de medios han sido: Primero; La garantía absoluta de su calidad, ampliamente comprobada por los principales laboratorios de todo el mundo. Segundo; La constancia de la uniformidad del medio, sobre todo de aquellos que contienen ingredientes insolubles, como partículas de carne, como es el caso del SALT MEAT BROTH o Caldo Salado de Carne - medio de enriquecimiento para los estafilococos -

y el COOKED MEAT MEDIUM o Medio de Carne Cocida. Tercero; Por permitirnos trabajar siempre con medios frescos recién preparados, aún tratándose de pequeñas cantidades. Cuarto; Porque dado el gran volumen de material a estudio, nos permitía ahorrar tiempo en el pesaje y preparación. Después de la experiencia obtenida al trabajar con ellos, los consideramos desde todo punto de vista, recomendables y de absoluta confianza.

OPERACIONES PRELIMINARES

Procedíamos a comprar setenta y cinco gramos aproximadamente del alimento de mayor consumición de cada grupo. Lo transportábamos en su propia envoltura hasta nuestro laboratorio. En la gran mayoría de las veces el papel que servía de envoltura a estos alimentos fué un papel especial adquirido por los establecimientos para esta finalidad, de color gris, grueso y sin ningún membrete. Este al ser analizado, no dió nunca cultivos positivos. Solo unas pocas veces el papel

de envoltura fué blanco con el membrete impreso del local de venta, que tampoco dió pruebas de estar contaminado.

El material de cada muestra era puesto en cápsulas de Petri previamente esterilizadas por aire caliente a 170° C durante veinte minutos. Usando material estéril (mascarilla, guantes, pinzas, tijeras y bisturí) procedíamos a picarla lo más fino posible, para añadirle luego agua destilada. Esta suspensión así preparada y cubierta, la dejábamos embeber durante treinta minutos para luego filtrarla. De este filtrado tomábamos con pipeta graduada estéril tres mililitros, que era el material que inoculábamos en los tubos que contenían el caldo de enriquecimiento, SALT MEAT BROTH o Caldo Salado de Carne.

Al realizar esta operación tuvimos siempre la precaución de extraer el material a estudiar del centro mismo del embutido, ya que nos servía de pauta la experiencia de GIANELLI, quien cita un caso de intoxicación por consumo de mortadela, después de haber estado esta en la estufa a 85° C durante

veinticuatro horas de lo que concluye, que la grasa contenida en la periferia de este tipo de alimentos protege del calor el interior de los embutidos, quedando también protegidos los posibles estafilococos existentes en esta zona; razón única que sirve para explicar el tan conocido caso de intoxicación por mortadela.

P A U T A A N A L I T I C A

Los estafilococos no son de los más exigentes microorganismos en requerimientos nutritivos. Crecen fácilmente en medios que contengan extracto de carne y peptona, razón por la cual hemos empleado como medio de enriquecimiento el SALT MEAT BROTH, o Caldo Salado de Carne, cuya composición por litro es la siguiente:

Peptona	10.	gramos
Extracto de carne	10.	gramos
Tejido neutro de corazón de buey	30.	gramos
Cloruro sódico	100.	gramos

pH 7.6 (aproximadamente)

Preparación: Para preparar este medio es más aconsejable usar la forma en tabletas. Añadir dos tabletas a tubos que contengan diez mililitros de agua recién destilada o agua hervida fría, tapar y dejar embeber quince minutos, luego esterilizar en el autoclave a 121° C durante un cuarto de

hora. Sacar y dejar enfriar a la temperatura ambiente con lo que el medio queda listo para ser usado.

Uso: Cada tubo conteniendo diez mililitros de este caldo, lo inoculábamos con tres mililitros del filtrado obtenido en la operación anterior. Los tubos de enriquecimiento así cultivados los poníamos a incubar durante cuarenta y ocho horas a 37° C, al término del cual era notorio una turbidez homogénea, debida posiblemente al crecimiento bacteriano y perfectamente diferenciable por la densidad del color amarillo, de los tubos sin crecimiento.

Experiencia y Resultados: Considerando que este es un medio altamente salado (cien gramos de cloruro sódico por litro) hemos podido comprobar que su poder inhibidor, basado en esta propiedad, es altamente eficaz para las bacterias no-patógenas, permitiéndonos hacer desde ya una primera selección, aún tratándose de muestras muy contaminadas, como lo era la carne picada.

Recomendación: Para obtener los mejores resultados que este medio puede ofrecer, es imprescindible las cuarenta y ocho horas de incubación y que el medio sea fresco, es decir, que esté recién preparado.

MEDIOS SELECTIVOS

Los medios selectivos, son generalmente medios sólidos que nos permiten hacer una distinción grosera de los gérmenes que nos interesan, basándonos en las características morfológicas de las colonias que en el se forman. Nosotros hemos empleado los siguientes:-

MANNITOL SALT AGAR

O Agar Salado de Manita. Este medio considerado de gran poder inhibidor, lo hemos empleado para estudiar la fermentación del manitol. Característica esta de gran importancia

para valorar la patogenicidad de los estafilococos.

Composición: Su composición por litro es:-

Extracto de carne	1.	gramo
Proteosa Peptona	10.	gramos
Cloruro Sódico	75.	gramos
Mannitol	10.	gramos
Agar	15.	gramos
Rojo de Fenol	0.25	gramos

pH 7.4 (aproximadamente)

Preparación: Dado el número de muestras para estudiar y porque utilizamos placas de Petri grandes, (doce centímetros de diámetro) preparábamos este medio en cantidades de un litro. Poníamos ciento once gramos de MANNITOL SALT AGAR en un matraz limpio, seco y con capacidad aproximada de dos y media veces el volumen del medio a preparar, es decir, un matraz de dos litros y medio; añadíamos luego y poco a poco, un litro de agua destilada. Movi-

mientos constantes ayudan a hacer la mezcla más homogénea. Poníamos un tapón y dejábamos embeber por quince minutos. Luego lo calentábamos en baño María hasta su ebullición, que es cuando el agar se funde completamente. La mejor manera de comprobarlo, es poder ver con claridad los objetos a su través, (por transparencia). Lo esterilizábamos en el autoclave a 121° C durante quince minutos, al término del cual lo dejábamos enfriar hasta 50° C para verterlo luego en placas de Petri estériles de doce centímetros de diámetro, las que dejábamos endurecer a la temperatura de habitación. Con este medio así preparado se obtiene una vistosa masa sólida de color rojo púrpura.

Experiencia y Resultados: Una vez solidificado el medio y seca su superficie, practicábamos sobre él, una siembra por agotamiento con asa de MANZANETE fuertemente cargada con Caldo Salado de Carne inoculado e incubado de cuarenta y ocho horas. Las placas así sembradas eran incubadas durante treinta y seis horas a 37° C en posición invertida,

con el fin de evitar que el agua de condensación caiga sobre la superficie del medio y se formen canales por donde se difundan las bacterias.

Pasadas las treinta y seis horas de incubación, procedíamos a hacer la lectura de las placas de acuerdo a la siguiente pauta: los estafilococos que fermentan la manita o presumiblemente patógenos, forman colonias redondas grandes de color amarillas y están rodeadas por una zona también amarilla. Los estafilococos no fermentadores de la manita, forman colonias pequeñas, rodeadas de una zona de color rojo o púrpura, es decir, que no producen cambio de color en el medio de su alrededor.

A las colonias con las características antes citadas, las tocábamos con asa de platino rectificada, procurando tocar solo el centro de la colonia sin llegar a hacerlo hasta la superficie del agar. Con este material, hacíamos una extensión sobre un portaobjetos y lo teñíamos

con el método de GRAM y lo mirábamos al microscopio. Observábamos, primero, si tomaban el GRAM, es decir, si eran gram-positivos, y segundo, ver como se agrupaban. La agrupación característica en racimos de uvas propia de los medios sólidos, nos hacía considerarlos como estafilococos fermentadores de la manita. Comprobado de esta forma que se trataba de estafilococos y con la finalidad de ir obteniendo cultivos puros, procedíamos a sembrar estas colonias, en otro medio de enriquecimiento que era el COOKED MEAT MEDIUM o Medio de Carne Cocida.

COOKED MEAT MEDIUM

El COOKED MEAT MEDIUM o Medio de Carne Cocida, lo hemos empleado por su extraordinaria capacidad para iniciar el crecimiento de bacterias aeróbicas y anaeróbicas y porque mantiene la viabilidad de las bacterias por largos períodos de tiempo.

Composición: Su composición por litro es:

Corazón de vaca	454.	gramos
Proteosa Peptona	20.	gramos
Dextrosa	2.	gramos
Cloruro Sódico	5.	gramos

pH 7.2 (aproximadamente)

Preparación: Este medio requiere más tiempo en su preparación, debido a que las partículas sólidas de carne que contiene dificultan el pesaje y su manipulación, más difícil para cantidades pequeñas. Nosotros hacíamos la preparación directa del medio en el tubo de ensayo. Poníamos 1.25 gramos de este granulado de carne en cada tubo y diez mililitros de agua destilada, poníamos los tapones adecuados y lo dejábamos embeber durante quince minutos, que era cuando las partículas de carne estaban completamente humedecidas. Preparados de esta manera el número exacto de tubos que íbamos a usar, lo esterilizábamos en el autoclave a 121° C durante quince minutos, después del cual y dejado enfriar, se

puedan distinguir dos capas claramente definidas, una superficial líquida de color amarillo ambar y otra densa con partículas de carne en el fondo.

Uso: Hemos empleado este medio para sembrar aquí solo las colonias que por las características de crecimiento en el medio MANNITOL SALT AGAR habían fermentado la manita y sospechábamos que eran estafilococos patógenos. La inoculación en este medio la hacíamos con asa de platino recta y por inmersión en el interior de la capa cárnea.

Recomendación: Es preciso que la inoculación de este medio se haga entre las partículas sólidas de carne. Es conveniente usarlo recién preparado, de ahí que se hace necesario preparar el número exacto de tubos que se va a usar en ese momento.

Resultados y Experiencia: Los tubos así sembrados e incubados a 37° C durante veinticuatro horas, daban un crecimiento

que podríamos calificar de muy bueno. Este medio cumple so
bradamente su finalidad.

Con material de aquí extraído procedíamos a sembrar placas
de Petri de doce centímetros de diámetro que contenían
STAPHYLOCOCCUS MEDIUM N° 110, el segundo de los medios selec
tivos por nosotros empleado.

STAPHYLOCOCCUS MEDIUM N° 110

Este medio es sin duda el más práctico y útil de todos cuan
tos hasta aquí hemos usado. Cuando es aprovechado al máximo,
podemos investigar con él las siguientes propiedades:
Primero; La formación de pigmento. Segundo; La fermentación
del manitol. Tercero; La producción de gelatinasa.

Composición: Su composición por litro es:

Extracto de levadura	2.5	gramos
Tryptona	10.	gramos
Gelatina	30.	gramos
Lactosa	2.	gramos
Manitol	10.	gramos
Cloruro Sódico	75.	gramos
Fosfato Dipotásico	5.	gramos
Agar	15.	gramos

pH 7 (aproximadamente)

Preparación: Preparábanos este medio en cantidades de litro, para lo cual poníamos ciento cuarenta y nueve gramos del producto deshidratado, en un matraz de dos y medio litros. Luego vertíamos un litro de agua recientemente destilada, poníamos un tapón de algodón y dejábamos embeber quince minutos. Posteriormente lo calentábamos al baño María hasta su completa ebullición, que es cuando el agar que contiene se funde completamente. En el mismo matraz, procedía

mos a esterilizarlo en el autoclave a 121° C durante quince minutos. Pasados estos y antes de dejarlo enfriar completamente, agitábamos suavemente, y procurando que no se formen burbujas, lo vertíamos en placas de Petri estériles de doce centímetros de diámetro, dejándolas solidificar a la temperatura de la habitación, dando finalmente una masa sólida de color blanco transparente.

Experiencia y Resultados: Nosotros hemos utilizado este medio para estudiar la capacidad formadora de pigmento de los estafilococos y la producción del enzima, gelatinasa, ambos considerados como caracteres fundamentales para valorar su patogenicidad.

Seca la superficie del medio así preparado, procedíamos a la siembra con material procedente de los tubos que contenían COOKED MEAT MEDIUM (Medio de Carne Cocida) sembrado e incubado durante veinticuatro horas. La siembra la practicábamos por punción. Realizada esta poníamos a incubar las pla

cas a 37° C durante cuarenta y ocho horas, al término del cual procedíamos a la lectura. Investigábamos primeramente la pigmentación. Observábamos como sobre la superficie del medio crecían solo dos tipos de colonias: blancas y naranjas, distinguibles perfectamente por su color. De nuestro interés eran principalmente las colonias color naranjas o amarillas, consideradas como productoras del pigmento dorado, característica fundamental del *Staphylococcus Aureus*.

Picábamos cinco colonias de las más características y un número igual de colonias blancas. Las colonias blancas que extraíamos de este medio, fueron posteriormente sometidas a las mismas pruebas que las colonias doradas. Lo hacíamos con el fin de comparar su comportamiento frente a las distintas pruebas.

Nosotros, durante este trabajo hemos podido confirmar la opinión de EVANS de que los estafilococos coagulasa-positivos producen, en este medio, una pigmentación más fuerte que

la que producen en el agar simple, con el que también hemos experimentado.

También estudiamos sobre este medio, la prueba de liqüefacción de la gelatina; para ello, cubríamos la placa sembrada y crecida de cuarenta y ocho horas, con cinco mililitros de Solución Saturada de Sulfato Amónico; la volvíamos a incubar diez minutos más, pasado los cuales, examinábamos los resultados. Podíamos ver como las colonias que habían producido pigmento amarillo formaban a su alrededor un halo claro. Las colonias que poseían este halo claro las consideramos como gelatinasa-positivas. A estas colonias las picábamos con asa de platino rectificada y las sembrábamos en tubos que contenían BRAIN HEART INFUSION o Infusión de Cerebro-Corazón, con la finalidad de procurar un mejor crecimiento y un cultivo puro. Durante los primeros casos hicimos simultáneamente la reacción de STONE, pero luego la abandonamos, al ver que los resultados eran siempre paralelos.

BRAIN-HEART INFUSION

O Infusión de Cerebro-Corazón. Este medio fué creado especialmente para favorecer el crecimiento de organismos difíciles de cultivar y en él, los estafilococos, según nuestra experiencia, se multiplican copiosamente.

El BRAIN-HEART INFUSION tiene la particularidad de conservar íntegra la virulencia, antigenicidad y otras características serológicas de los microorganismos en él sembrados.

Composición: Su composición por litro es la siguiente:

Infusión de cerebro de ternera ...	200.	gramos
Infusión de corazón de vaca	250.	gramos
Proteosa Peptona	10.	gramos
Dextrosa	2.	gramos
Cloruro Sódico	5.	gramos
Fosfato Disódico	2.5	gramos

pH 7.4 (aproximadamente)

Preparación: El proceso de preparación es exactamente igual que para los otros medios deshidratados. Nosotros lo preparábamos en cantidades pequeñas, ya que su mayor eficacia se consigue con el medio recién preparado. Se conserva bien cuando es mantenido en el refrigerador, pero requiere antes de volverlo a usar que se lo caliente hasta la temperatura de ebullición, para que de esta manera pierda el oxígeno absorbido. Es importante no agitarlo demasiado durante el proceso de enfriamiento.

Experiencia y Resultados: Nosotros lo hemos empleado para sembrar en él todas aquellas colonias de estafilococos que se habían comportado como fermentadores de la manita, productoras de pigmento dorado y licuadores de la gelatina. La siembra de colonias con estas características la hacíamos como un paso preparatorio, antes de realizar la prueba de la coagulasa. La técnica empleada en la siembra de estos tubos, fué la corrientemente empleada para estos casos, es decir, usando una asa de platino rectificada, picábamos las colonias

del STAPHYLOCOCCUS MEDIUM N° 110 y la introducíamos en tubos, que contenían generalmente diez mililitros del medio estéril; luego lo poníamos a incubar veinticuatro horas a 37° C, al cabo del cual, veíamos como el limpio color amarillo del medio recién preparado, se transformaba en un color opaco y opalescente debido al crecimiento bacteriano producido.

TELLURITE GLYCINE AGAR

Con este medio hemos investigado la propiedad que tienen los estafilococos patógenos, de crecer en presencia de la Telurita. Sembrábamos aquí aquellos estafilococos que habían dado positivas las reacciones antes investigadas. Se trata de un medio selectivo altamente específico que solo permite el crecimiento de las cepas patógenas de los estafilococos que tienen capacidad para coagular el plasma. El crecimiento se produce dentro de las primeras veinticuatro

horas, formando sobre él colonias de color negro.

Composición: La composición de este medio por litro es la siguiente:-

Extracto de levadura	6.5	gramos
Tryptona	10.	gramos
Soytona	3.5	gramos
Manitol	5.	gramos
Clicina	10.	gramos
Fosfato Dipotásico	5.	gramos
Cloruro Lítico	5.	gramos
Agar	17.5	gramos

pH 7.2 (aproximadamente)

Preparación: Este medio consta de dos partes, el polvo deshidratado y un complemento líquido, llamado CHAPMAN TELLURITE SOLUTION.

Nosotros lo preparábamos siempre en cantidades de a litro.

Vertíamos 62.5 gramos del TELLURITE GLYCINE AGAR deshidratado, en un matraz con capacidad de dos litros y medio. Añadíamos luego un litro de agua recién destilada y al igual que los demás medios, lo dejábamos embeber durante un cuarto de hora, para luego calentarlo al baño María hasta su ebullición completa, que es cuando el medio alcanza su completa dilución. Posteriormente lo llevábamos al autoclave y lo esterilizábamos a 121° C de temperatura durante un cuarto de hora. Lo sacábamos del autoclave, lo dejábamos enfriar hasta 50° C y es aquí cuando completábamos su preparación, añadiéndole el CHAPMAN TELLURITE SOLUTION. La dosis recomendada para un litro de medio, es de dos mililitros por cada cien mililitros de medio preparado, es decir, que para un litro usábamos veinte centímetros cúbicos. Esta operación tiene que ser hecha en condiciones de absoluta asepsia. Se agita un poco para que la mezcla se haga mejor y procurando no hacer burbujas, lo vertíamos en placas de Petri pequeñas, preparadas y esterilizadas adecuadamente para tal efecto. Lo dejábamos solidificar a la temperatura ambiente, y finalmente se forma una masa sólida de color amarillo, muy vistoso.

Precaución: Es muy importante no calentar el medio una vez puesto el CHAPMAN TELLURITE SOLUTION. Con cantidades menores a las descritas de CHAPMAN TELLURITE SOLUTION, el crecimiento se enlentece y necesita más de veinticuatro horas de incubación. La asepsia es imprescindible al poner el CHAPMAN TELLURITE SOLUTION.

Experiencia y Resultados: Secas las superficies del medio, procedíamos a sembrarlas con material extraído de los tubos que contenían BRAIN-HEART INFUSION (sembrado y cultivado). Sobre la superficie de este medio practicamos la siembra, usando la técnica de estrías. Sembrada cada placa de esta forma, obtuvimos crecimientos francamente estupendos, con colonias perfectamente individualizadas que era lo que queríamos conseguir.

Sobre este medio comprobamos que tanto las colonias que habían producido pigmento amarillo, como las que habían producido pigmento blanco, en el STAPHYLOCOCCUS MEDIUM Nº 110,

daban colonias color negro. Las colonias con estas características, las considerábamos formadas por presuntos STAPHYLOCOCCUS AUREUS coagulasa-positivos. El crecimiento de colonias negras sobre un medio sólido amarillo, forma un bonito contraste, fácilmente identificable.

Las placas así sembradas solo necesitan veinticuatro horas de incubación. Durante este tiempo, no crecen colonias de otro color. Como curiosidad experimental, cultivamos algunas placas con estafilococos no-patógenos. Vimos que estos forman aquí colonias color gris y que su crecimiento empieza después de pasadas las primeras veinticuatro horas.

Recomendación: Consideramos el empleo de este medio como imprescindible para el estudio de los estafilococos coagulasa-positivos, pero dada su alta especificidad debe ser usado junto con el MANNITOL SALT AGAR y el STAPHYLOCOCCUS MEDIUM 110.

BLOOD AGAR BASE

O Agar Base Para Sangre. Este medio lo hemos empleado para investigar la capacidad hemolítica de los estafilococos. Dado que este medio no contiene carbohidratos, es de gran utilidad para estudiar las características y los diversos tipos de hemólisis de las colonias bacterianas que en él crecen.

Composición: Su composición por litro es:

Infusión de corazón de vaca	500.	gramos
Triptosa	10.	gramos
Cloruro Sódico	5.	gramos
Agar	15.	gramos

pH 6.8 (antes de añadir la sangre)

Preparación: Nosotros lo preparábamos de la siguiente manera: En un matraz limpio de dos litros, vertíamos un litro de agua destilada fresca y cuarenta gramos del BLOOD AGAR

BASE deshidratado. Procedíamos luego a calentarlo al baño María hasta que el agar que contiene se funda completamente, lo que casi siempre se consigue a la temperatura de ebullición. Conseguida la fusión del agar, y usando el mismo matríz procedíamos a esterilizarlo en el autoclave a 121° C durante quince minutos. Terminada la esterilización, lo sacábamos y lo dejábamos enfriar hasta los 50° C. Estando aun el medio líquido, procedíamos a añadirle el cinco por ciento de sangre de cordero, esto es, cincuenta mililitros de sangre para un litro de medio. Lo agitábamos ligeramente para homogenizar más la mezcla y procurando no hacer burbujas, lo vertíamos en placas de Petri de doce centímetros de diámetro, preparadas y esterilizadas para este efecto.

Experiencia y Resultados: Una vez que el medio ha sido esterilizado, añadido la sangre, puesto en las placas de Petri y solidificado, lo poníamos a incubar por veinticuatro horas a 37° C, como una medida de precaución y para estar seguros de la ausencia de gérmenes. Después de esta primera incuba

ción procedíamos a sembrar las placas, usando la técnica de puntura. Como inóculo, usábamos el BRAIN-HEART INFUSION o Infusión de Cerebro-Corazón sembrado e incubado veinticuatro horas; hecho esto, poníamos nuevamente a incubar estas placas durante otras veinticuatro horas a 37° C, luego, a temperatura del refrigerador por doce horas.

Las cepas de estafilococos productoras de Hemolisina Alfa, se rodeaban de una zona de hemólisis completa, de contornos irregulares. El diámetro de esta zona fué siempre constante, incluso después de su permanencia en el refrigerador.

Las cepas de estafilococos que producían Hemolisina Beta, formaban a su alrededor una zona que se distinguía por tener sus contornos muy bien limitados y cuyo diámetro se agrandaba después de la permanencia en el frío.

Solo unas pocas cepas de estafilococos produjeron ambas hemolisinas, Alfa y Beta; en este caso se observa sobre la placa de Petri la formación de una doble aureola. Una, de

contorno irregular y hemolisis completa, que corresponde a la Hemolisina Alfa. Rodeando a esta existe otra, de hemolisis parcial y contorno bien limitado, que corresponde a la Hemolisina Beta.

En el estafilococo, la capacidad de producir hemolisis y la virulencia, marchan paralelas.

Recomendaciones: Es siempre conveniente desde todo punto de vista, preparar exactamente la cantidad de medio que se va a usar en ese momento. Si el medio no se usa inmediatamente después de su preparación, requiere volver a licuarlo y dejarlo nuevamente solidificar. La ligera reacción ácida de este medio, es una ventaja que ayuda a conservar la vida de los hematíes. Según nuestra experiencia, con estas precauciones se consigue un mejor desarrollo de las zonas de hemolisis, que se presentan más claras y diferenciables. Con medios de reacción alcalina como el MEAT INFUSION BLOOD AGAR, no se consiguen zonas de hemolisis tan claras y diferenciables.

DNASE TEST AGAR

Es un medio para investigar la producción de la enzima desoxirribonucleasa. Esta enzima la producen solo los estafilococos patógenos. Hemos empleado este medio en nuestra investigación por compartir la opinión de muchos investigadores que consideran que estudiar la actividad de la desoxirribonucleasa es tan importante como la producción de coagulasa.

Composición: La composición de este medio por litro es la siguiente:

Triptosa	20.	gramos
Acido Desoxirribonucléico	2.	gramos
Cloruro Sódico	5.	gramos
Agar	15.	gramos

El ácido desoxirribonucléico que contiene este medio, es despolimerizado completamente por la enzima desoxirribonucleasa, producida por los estafilococos patógenos que crecen en este medio. Esto origina sobre la superficie del medio después de sembrado, una zona clara alrededor del punto de

cultivo. Este signo es el resultado positivo de la prueba. El resultado es negativo, cuando esta zona clara no se produce.

Preparación: Su preparación es igual de sencilla que los otros medios deshidratados que antes hemos descritos. Para un litro de agua destilada, se suspende cuarenta y dos gramos del medio deshidratado. Dejamos embeber durante quince minutos, para luego calentarlo en baño Maria hasta su completa ebullición. En el mismo matraz, lo esterilizamos en el autoclave a quince libras de presión durante quince minutos. Terminado esta, lo vertíamos en placas de Petri estériles grandes, de doce centímetros de diámetro. Solidificado el medio y seca su superficie, procedíamos al cultivo por punción con asa de platino rectificado, sumergida ésta antes en BRAIN-HEART INFUSION o Infusión Cerebro-Corazón, previamente cultivado e incubado por veinticuatro horas. Hacíamos solo seis inoculaciones puntiformes en cada placa de Petri, que luego la poníamos a incubar por veinticuatro horas a 37° C.

Después de la fase de incubación vertíamos sobre la placa Acido Clorhídrico. Observamos como los estafilococos productores de desoxirribonucleasa - que en nuestro trabajo fueron todos los aquí sembrados - formaban un halo claro característico alrededor del punto donde antes habíamos hecho la inoculación.

Experiencia y Resultados: Durante todo nuestro trabajo con este medio, no tuvimos ningún resultado contradictorio. Aquellas cepas que por sus características bioquímicas habían sido consideradas patógenas, resultaron DNASE positivas. Nuestra opinión en cuanto al medio se refiere, podemos decir que es del todo recomendable y de absoluta confianza, aunque caro y difícil de conseguir.

PRUEBA DE LA COAGULASA

Nosotros hemos investigado la coagulasa libre, mediante la prueba de coagulación en el tubo de ensayo, y la coagulasa conjugada, mediante la prueba de aglutinación en el portaob

jeto.

Para realizar la "prueba del tubo" y la del portaobjetos, hemos usado como material de inoculación el BRAIN-HEART INFUSION o Infusión de Cerebro-Corazón cultivado e incubado por veinticuatro horas con colonias que hasta aquí habían dado resultados positivos con las pruebas de: fermentación de la manita, producción de pigmento amarillo, producción de gelatinasa, crecimiento en el medio de Tellurita y hemolisis. El otro elemento usado para la prueba, fué el plasma de conejo desecado y luego rehidratado para este propósito.

Preparación: Empleamos en nuestra experiencia plasma de conejo deshidratado, llamado comercialmente "PLASMA COAGULASE". Rehidratábamos una ampolla de ésta, con tres mililitros de agua destilada. Esta cantidad nos servía para hacer seis determinaciones, de la coagulasa libre, o prueba del tubo. Cada prueba solo requiere de 0.5 centímetros cúbicos.

Técnica para determinar la Coagulasa Libre o Prueba del Tubo:

Con pipeta estéril de calibre apropiado extrafamos medio centímetro de plasma de conejo ya rehidratado y lo vertíamos en un tubo de hemolisis limpio y estéril. Luego poníamos medio mililitro de BRAIN-HEART INFUSION cultivado e incubado durante veinticuatro horas, lo agitábamos ligeramente para mejorar la mezcla y lo poníamos en baño María a 37° C de temperatura. Hacíamos tres lecturas, la primera, a la hora; la segunda, a las tres horas. Durante este tiempo cualquier grado de coagulación lo considerábamos como resultado positivo. Si la coagulación no se producía durante este tiempo, hacíamos una tercera lectura a las veinticuatro horas, dejando el tubo en estas mismas condiciones y observando el resultado. Los casos francamente positivos se caracterizaban porque la coagulación tenía tal grado de solidez que se podía invertir la posición del tubo sin que se derrame el contenido. Tuvimos casos en que la coagulación se produjo después de la quinceava hora. En nuestra experiencia, encontramos que todas aquellas colonias que habían venido comportándose como positivas frente a las reacciones bioquí

micas antes mencionadas, se comportaron también como positivas ante esta prueba. Solo una cuarta parte de ellas, produjeron una coagulación tardía. Esta prueba que sirve para valorar la fracción libre de la coagulasa se produce porque la bacteria elabora una sustancia llamada procoagulasa, que es la que reacciona con otra sustancia contenida en el plasma, llamada co-factor o activador plasmático. Esta última tiene características muy parecidas a la protrombina, pero sin llegar a identificarse con esta, de la que es posible separarla mediante filtración con filtros de SEITZ, que retienen la protrombina. Este co-factor que existe solo en el plasma humano, de conejo y de caballo y no en el de la rata, ratón o cobayo, explica el comportamiento o la sensibilidad de estos animales frente a las infecciones por estafilococo.

Técnica de la prueba de aglutinación sobre el portaobjeto:

Esta tiene como finalidad determinar la fracción ligada de la coagulasa o coagulasa conjugada. En los primeros casos, la hacíamos simultáneamente con la prueba del tubo. Su téc

nica es sencilla y sus resultados inmediatos. La empleamos también para estudiar la coagulación tardía.

Su técnica consiste en poner sobre un portaobjeto limpio, primero una gota de agua destilada, luego una gota de BRAIN-HEART INFUSION, cultivado con los estafilococos a estudiar, y por último una asa cargada con solución de plasma coagulasa. Esperamos medio minuto, luego examinamos para ver si la aglutinación se ha producido. Esta se manifiesta por la formación de grumos blancos muy pequeños pero perfectamente visibles a simple vista, y apreciados mejor con lupa de pequeño aumento.

Esta prueba tiene la ventaja de su sencillez y que no existe la posibilidad de reacciones positivas falsas. Nuestros resultados con esta prueba fueron paralelos en su mayoría a los obtenidos con la prueba del tubo. Además de los esta filococos, también coagula el plasma el Escherichia Coli. Esta posibilidad fué descartada fácilmente por el estudio bioquímico de las otras reacciones practicadas con anteriori

dad, por la morfología bacteriana y el método de GRAM.

Durante la realización de esta prueba, empleamos siempre tu bos testigos, los cuales unos, contenían medio centímetro de plasma coagulasa con igual cantidad de agua destilada, y otros, plasma coagulasa con STAPHYLOCOCCUS ALBUS. En ningu no de estos se produjo nunca coagulación.

Finalmente y a manera de experiencia, decidimos aprovechar el plasma de los ratones que teníamos para la experimentación animal. Preparado este convenientemente, hicimos la misma prueba pero ahora usando este plasma. Observamos que las ce pas que habían coagulado el plasma de conejo, no coagulaban el plasma de ratón, porque este carece del co-factor o activador plasmático. Luego vimos, que si a este plasma de ratón le añadíamos fibrinógeno, la coagulación se producía.

EXPERIMENTACION ANIMAL

Los numerosos trabajos realizados con animales para estudiar la producción de enterotoxina dan resultados variados y a veces contradictorios, según la escuela de que se trate. Así por ejemplo, DOLMAN y WILSON conceden todo crédito e importancia al KITTEN TEST o Prueba del Gatito, en cambio otros como ALLISON y FULTON desconfían totalmente de esta prueba, a tal punto que no le conceden ningún valor.

Ante la imposibilidad por motivos obvios, de contar con la colaboración de voluntarios humanos, considerados por su sensibilidad como ideales para este tipo de pruebas, y de conseguir monos *Macaccus Rhesus* - considerados por DACK como el animal más sensible, hemos empleado para nuestra investigación y de acuerdo a nuestras posibilidades, gatitos jóvenes, ranas y ratones blancos.

PREPARACION

En la realización de todas nuestras experiencias hemos usado como inóculo el BRAIN-HEART INFUSION o Infusión Cerebro-Corazón, cultivado con cepas de STAPHYLOCOCCUS AUREUS coagulasa-positivos e incubados durante veinticuatro horas a 37° C. Tomábamos diez mililitros de este medio y lo centrifugábamos a cinco mil revoluciones por minuto, durante diez minutos. El líquido sobrenadante de esta operación era pasado através de un filtro de SEITZ estéril. Al filtrado así obtenido le añadíamos formol, con el fin de destruir las posibles hemolisinas existentes capaces de producir en el animal en estudio, una reacción orgánica ajena que pueda confundir nuestros resultados.

La dosis a inyectar la calculábamos de acuerdo al peso y a la edad del animal. Utilizamos gatos de aproximadamente cuatro a seis semanas, con un peso que oscilaba entre trescientos cincuenta y cuatrocientos cincuenta gramos aproxima



damente. En las ranas y ratones no hicimos estas determinaciones y la dosis que inyectamos en estos fué de dos y medio mililitros.

En los gatos usamos siempre la via intraperitoneal para practicar la inyección del inóculo y esta fué siempre de cinco mililitros. Empleamos animales testigos. A estos inoculamos usando la misma via y la misma técnica, seis mililitros de BRAIN-HEART INFUSION, estéril, es decir, un mililitro más que al animal de experimentación.

EXPERIMENTACION SOBRE EL GATO

Nuestra investigación fué mayormente hecha sobre este animal. Nos decidimos a trabajar con él aún conociendo las controversias y las diversas interpretaciones que se han hecho a sus resultados. Nosotros creemos en las investigaciones de MATHESON y THATCHER quienes en 1955, volvieron a re-examinar

esta prueba con el fin de aclarar la controversia existente. El resultado de sus experiencias confirmó ampliamente el valor del KITTEN TEST propuesto por DOLMAN y colaboradores en 1940. Estos investigadores recomendaron la via intraperitoneal para la inoculación del gato y esta es la que nosotros hemos empleado.

Preparación: Los gatos utilizados por nosotros pesaron todos alrededor de trescientos cincuenta a cuatrocientos cincuenta gramos. Antes de someterlos a la prueba, los teníamos dos días en observación con el fin de comprobar si no estaban afectados de algún proceso que pudiera perturbar nuestros resultados. La inyección la practicábamos por la tarde, estando el animal completamente en ayunas. Para efectuar ésta, contabamos con la colaboración de por lo menos dos ayudantes, quienes mantenían el animal lo más inmovilizado posible.

Técnica: Procedíamos a colocar el animal boca arriba y en esta posición afeitábamos unos tres centímetros de la piel

del abdomen, es decir, el punto donde íbamos a practicar la inyección. Hacíamos la esterilización local con alcohol y luego usando aguja corta pero gruesa y jeringuilla de veinte centímetros cúbicos estéril, puncionábamos primero oblicuamente la piel del abdomen, para luego y una vez atravesada esta, cambiar de dirección la aguja dándole una orientación perpendicular hasta perforar el peritoneo suavemente.

Experiencia: Las primeras inoculaciones hechas fueron muy laboriosas siendo la principal dificultad conseguir dominar al animal para poder practicar la inyección adecuadamente.

Una vez inyectado el animal lo poníamos nuevamente en su jaula y lo teníamos en observación durante seis horas. En todos los casos, incluso en aquellos en que la prueba fué positiva, los primeros veinte minutos los animales demostraron la más absoluta normalidad. Pasados estos y de manera brusca, presentaban, torpeza en sus movimientos, inestabilidad en sus pasos, sialorrea; luego, vómitos en escopeta,

contracciones de vientre y diarrea mucosanguinolenta. Los animales empezaban a sentirse libres de sus molestias después de la tercera hora de la inoculación. El restablecimiento total lo observamos en todos nuestros casos, pasadas las seis horas.

En los animales testigos inyectados con la misma técnica pero con BRAIN-HEART INFUSION estéril, nunca observamos ningún trastorno. Esto nos permitía deducir que los trastornos producidos en el gato se debían a la acción de la enterotoxina producida por las cepas de STAPHYLOCOCCUS AUREUS, contenidas en el caldo inoculado.

Debido al elevado número de pruebas que teníamos que realizar y con criterio puramente experimental, utilizamos en diez casos, pero ahora como testigos, los gatitos que antes nos habían servido para la prueba. Los resultados de estos casos fueron tan fieles como los primeros.

EXPERIMENTACION SOBRE LA RANA

Siguiendo la experiencia de ROBINSON y MAIDA, hemos experimentado también con ranas. Queríamos estudiar la sensibilidad y forma de reaccionar de estos animales, frente a los estafilococos patógenos y su enterotoxina. Los resultados de trabajos hechos con este animal son contradictoriamente interpretados.

Preparación y Técnica: Hemos utilizado la Rana Esculenta por ser esta la especie más adecuada para este tipo de investigación. Hemos empleado la técnica seguida por otras escuelas para poder comparar los resultados.

Como material de inoculación hemos empleado, por un lado, caldo cultivado con las cepas que habían dado positiva la prueba del KITTEN TEST, y por otro, caldo cultivado con cepas de estafilococos patógenos, pero no enterotóxicos. Con las cepas de estafilococos patógenos y enterotóxicos obteníamos cultivos puros.

Para la conservación de estas cepas, o cualquier otra de nuestro interés, usamos un agar especialmente preparado para este fin llamado DEXTROSE STARCH AGAR, o Agar de Glucosa Almidón.

DEXTROSE STARCH AGAR

Su composición por litro es:

Proteosa Peptona	15.	gramos
Almidón soluble	10.	gramos
Dextrosa	2.	gramos
Cloruro Sódico	5.	gramos
Fosfato Disódico	3.	gramos
Gelatina	20.	gramos
Agar	10.	gramos

pH 7.3 (aproximadamente)

Como medio para conservar colonias es excelente. Por lo completo de su fórmula, también puede ser usado como medio de crecimiento. Recomendamos que se use el mismo día de su preparación.

La técnica empleada para la inoculación es tal vez la más sencilla de todas cuantas hemos hecho en animales. Con ella hemos seguido nuestra pauta de mantener en observación por lo menos veinticuatro horas el animal antes de someterlo a la prueba, para descartar la posibilidad de alguna enfermedad.

En el momento de la inyección y con la colaboración de un ayudante, quien nos sujetaba la rana, inyectábamos en el saco dorsal de esta, dos y medio mililitros de BRAIN-HEART INFUSION, cultivado e incubado con cepas de estafilococos patógenos coagulasa-positivos en el animal de prueba. Llegar al saco dorsal de la rana es fácil. Empleando una aguja larga y puncionando por la raíz de una de las extremidades posteriores de esta, dirigimos la aguja hacia arriba

pero superficialmente.

Con el animal testigo, practicábamos la inyección en estas mismas condiciones y con esta misma técnica, pero usando como inóculo el BRAIN-HEART INFUSION estéril. La dosis que inyectábamos en la rana testigo era de tres mililitros, es decir, medio mililitro más que la dosis inyectada en el animal de experimentación.

Experiencia y Resultados: Hecha la inoculación manteníamos en observación al animal de experimentación y su testigo durante tres horas. Pasadas estas procedíamos a decapitarlas. Durante este período de observación, no pudimos notar nada anormal en su comportamiento. Nos llamó la atención, una discreta pero notoria tumefacción de las articulaciones de las extremidades posteriores, sobretudo a nivel de la articulación media. Este fenómeno se acompañaba de un ligero cambio de coloración de la piel de esta región. Este cambio consistía en una hiperpigmentación de estas regiones en am-

bas extremidades. Al principio nos pareció normal, pero luego, al estudiarlo con más detenimiento y ver que había casos en que este fenómeno no se producía, fué cuando lo consideramos un nuevo hallazgo. Buscando en la literatura una explicación a este fenómeno, encontramos que solo ha sido visto antes en aves, y por investigadores italianos. Otro hallazgo digno de mención fué la aumentada protusión ocular.

Practicada la decapitación y abierta la cavidad abdominal, procedíamos a examinar con detenimiento los órganos de esta. En todos nuestros casos solo hemos podido observar una gran dilatación de estómago, acompañada de fuerte contracción pilórica. En ninguno nos fué posible ver los movimientos peristálticos de estómago que algunos autores describen, ni aún en aquellos en que con este propósito los decapitamos antes de las tres horas, a los quince, treinta, cuarenta y cinco y sesenta minutos de practicada la inoculación.

En las ranas testigos que teníamos en observación no pudimos observar, ni la hiperpigmentación, ni la tumefacción articu-

lar. Con esta observación descartamos la posibilidad de que sea el medio base el agente causante de estos fenómenos. La autopsia de las ranas testigos mostró una completa normalidad de los órganos abdominales. A esta prueba se la conoce también con el nombre de TEST DE ROBINSON o FROG TEST.

Recomendaciones: El empleo de este tipo de animales para esta clase de investigación, tiene la considerable ventaja de su fácil adquisición y la sencillez de la técnica. A cambio ofrece que la veracidad de sus resultados es puesta en duda y no son aceptados por todos los investigadores. Nosotros pensamos que estos animales solo deben de ser usados como una prueba de confirmación y nunca como prueba biológica única. Nosotros la empleamos después del KITTEN TEST o Prueba del Gatito, inyectando medios cultivados con cepas que habían sido enterotóxicas para el gato, y con aquellas de dudosa clasificación. Los estafilococos que fueron negativos para el gato, lo fueron también para la rana. Por lo tanto, consideramos que el TEST DE ROBINSON es solo una prueba de confirmación complementaria.

EXPERIMENTACION CON RATONES

Son pocos los investigadores que han empleado ratones para estudiar la producción de la enterotoxina estafilocócica. Nosotros lo hicimos con la finalidad de comprobar el grado de resistencia frente al estafilococo patógeno y su enterotoxina.

Los ratones tienen la particularidad de carecer del co-factor o factor estimulante de la coagulación del plasma. Esta carencia explica su resistencia o falta de sensibilidad para las infecciones por estafilococos.

Técnica: En nuestro trabajo empleamos ratones blancos jóvenes que antes de inyectarlos, procedíamos a sedarlos ligeramente mediante la inhalación de un algodón impregnado de Eter Sulfúrico. Este lo depositábamos unos minutos dentro de su jaula para que el animal inhale y conseguir de esta manera inmovilizarlos para poder inyectarlos. Siguiendo

la técnica usual, practicando las precauciones antes referidas, y con la colaboración de un ayudante, procedíamos a practicar la inyección intraperitoneal de dos y medio mililitros de BRAIN-HEART INFUSION cultivado e incubado durante veinticuatro horas con cepas patógenas y enterotóxicas. A los ratones testigos, les inyectábamos medio mililitro más, es decir, tres mililitros de este mismo medio, pero sin cultivar, o sea, estéril.

Experiencia y Resultados: Los ratones son animales difíciles de trabajar con ellos, en los que hay que tener mucho cuidado con la anestesia. Dosis ligeramente elevadas les produce la muerte, a nosotros se nos murieron cuatro por este motivo. Después de practicada la inyección intraperitoneal, los cambiábamos de jaula y los teníamos en constante observación por tres horas. Durante este tiempo pudimos comprobar que efectivamente estos animales eran totalmente resistentes a los cultivos virulentos de estafilococos, ya que no presentaron ningún trastorno. Solo en dos casos se

formó un pequeño absceso en el sitio de la inoculación. Pasado el efecto de la anestesia, que duró aproximadamente cinco minutos, se recuperaron completamente. Luego procedimos a aumentar la dosis de inoculación a cuatro mililitros. Pretendíamos ver que pasaba con esta dosis que considerábamos excesiva para su peso. Tampoco pudimos observar ningún trastorno: su comportamiento fué normal, al examen físico no encontramos nada patológico, y el resultado de la necropsia, negativo.

E L A B O R A C I O N D E E M B U T I D O S

Y

-

F A S E S D E I M P O R T A N C I A

E P I D E M I O L O G I C A

Como indudablemente la presencia de estafilococos enterotóxicos en la carne picada, embutidos y fiambres puede tener múltiples orígenes, vamos a describir de una manera somera la materia prima que interviene en su preparación y las fases de elaboración hasta que el producto manufacturado llega al consumidor.

La industria chacinera comprende la fabricación de productos alimenticios a base de carne de cerdo pura o con mezcla.

La aceptación que han tenido estos productos ha hecho que esta industria se extienda por todos los países del globo y que sea cada vez más variada la modalidad de sus tipos, lo que hace difícil su catalogación.

La salchichería, o preparación de embutidos es la más importante de sus ramas. La salchichería antigua preparaba los embutidos exclusivamente con carne de cerdo. La salchichería actual y debido a la gran demanda de estas y al perfeccionamiento de las técnicas, emplean carne de vacuno, vísceras y hasta productos muy alejados de la carne, como son los huevos

y la leche. Los condimentos y las tripas son elementos indispensables en la fabricación de embutidos. La fabricación de embutidos se puede decir que empezó en un ambiente prácticamente familiar y se ha convertido en la actualidad en una verdadera industria con fisonomía especial y técnicas propias.

MATERIAS PRIMAS

Actualmente en la preparación de embutidos se emplean todos los productos comestibles de las reses de abasto, es decir, carne de cerdo, carne de vacuno, (buey, vaca, o ternera) y de équidos; respecto a este último debemos decir que el uso de carne equina, sea mulo o caballo, está prohibida en España para la fabricación de embutidos, pero está autorizada en otros países, previa declaración impresa en el producto.

La carne de mayor aceptación en la industria salchichera es sin duda la del cerdo, a tal punto que la calidad de un em-

butido se valora por el porcentaje mayor o menor de carne de cerdo que contiene. Todas las masas musculares del cerdo son aprovechables en salchichería. Dada la gran variedad de embutidos que se fabrican, se hace necesario emplear diferentes calidades de esta carne; así por ejemplo, vemos como las reses porcinas adultas, bien cebadas, y con firmes músculos son las más indicadas para la fabricación de los embutidos del tipo de: chorizos, salchicones, etc. Los cerdos jóvenes, con músculos blandos, son preferidos para la fabricación de salchichas escaldadas tipo Francfort, butifarras, butifarrones, mortadelas, etc. Los cerdos adultos, gordos, por los buenos perniles que poseen se emplean para preparar el Jamón Crudo o Jamón Serrano típico español y para obtener buenas hojas de tocino. En cambio, los cerdos jóvenes que no han llegado a su plena madurez sirven para preparar los jamones cocidos tipo Jamon de York. La carne de cerdo que se emplea para preparar los embutidos no necesita ninguna preparación, solo se retira de ella, las aponeurosis y partes tendinosas antes de llevarla a la picadora.

La principal ventaja de la carne de cerdo en la salchichería, es su crasitud. El buen sabor de sus productos se los debe a las materias sápidas que su grasa contiene. Por otra parte, la humedad de sus fibras musculares facilita las fermentaciones producidas por los microbios industriales y la consecución del embutido sazonado.

Actualmente la carne de buey, vaca o ternera se utiliza mucho para fabricar embutidos de todos los tipos y de fiambres cárnicos. En los mercados extranjeros existe una categoría de reses llamadas "Vacas de Salchichería", llamadas así por que poseen carnes que no son aceptables para la venta como tales, pero si para la industria del embutido. La carne de ternera por su elevado precio, solo se emplea en ruladas y otros fiambres. La carne de novillos no gordos, se utiliza para fabricar embutidos crudos, tipo mettwurst, salchichas madrileñas rojas y blancas; chorizo, loganizas, sobrasada, salchichón, etc. Las reses jóvenes y vacas flacas son buenas para fabricar salchichas escaldadas y embutidos cocidos.

La carne equina tiene cada día mayor aceptación en la industria salchichera pero fuera de España. Tiene como ventaja, el que proporciona a la pasta un tono rojo atrayente. Se la emplea mucho mezclada con la carne de cerdo para fabricar tipos especiales de salchichón. Su manipulación no requiere nada especial y en su preparación se emplean las mismas reglas e idéntica técnica, que para las otras clases de carne.

El empleo de sangre en la fabricación de embutidos es lo que caracteriza a la morcilla; embutido este conocido en los receptarios de todo el mundo. La sangre más apreciada es la del cerdo. La sangre de vacuno, se considera de inferior calidad y se emplea para fabricar morcillas de bajo precio, llamadas morcillas de "lustre". En la preparación de morcillas se emplea la sangre en estado líquido, es decir, sin coagular, por lo que se hace necesario el uso de anticoagulantes. La sangre como ingrediente principal de las morcillas tiene una corta vida comercial ya que se altera rápidamente y su alteración se reconoce por el tono rojo negruzco que adquiere,

haciéndola impropia para el consumo.

En la industria salchichera se aprovechan todas las vísceras del cerdo, aunque no todas tienen la misma apreciación en el mercado. Las vísceras antes de ser incorporadas al embutido, requieren una preparación previa, que varía de acuerdo a la víscera que se trate. Las vísceras más empleadas en la salchichería española son: hígado, lengua y corazón.

El hígado de cerdo requiere primero, la separación de tejidos extraños, entendiéndose por estos las aponeurosis, ganglios, vasos etc. Luego se lo somete a un remojo en agua fría que dura varias horas y se hace con la finalidad de que libere la sangre retenida en su trama. Por último, un escaldado ligero, que es con el que se consigue ese vistoso color característico. Muchos tipos de salchichas utilizan hígado de cerdo crudo, preparado únicamente con sal y nitro.

La lengua, en la industria chacinera se emplea para preparar

diversos tipos de morcillas, ruladas, etc. Su preparación previa consiste en separar sus inserciones cartilaginosas, su mucosa, etc. y someterla luego a un baño de agua templada para poder pelarla con facilidad.

El corazón, víscera esta respetada en algunas regiones, es en cambio aprovechada en otras para preparar morcillas, chorizos, etc. Requiere un período de cocción previo, para que se ablande y poder usarla.

El tocino y la manteca, son las únicas grasas permitidas en la preparación de los embutidos. En los embutidos baratos se sustituye la manteca por el cebo de vacuno.

CONDIMENTOS

La pasta de un embutido está compuesta fundamentalmente por carne de cerdo, a excepción de la morcilla que contiene

sangre, pero todos sin excepción llevan condimentos. Los condimentos son los que le proporcionan al embutido ese aroma agradable y grato comer que son el éxito de su aceptación. Los condimentos son por lo tanto, un componente indispensable para su preparación. La industria salchichera emplea condimentos que se pueden clasificar en vegetales y minerales.

Los condimentos minerales más empleados en esta industria son: la sal común y el nitro.

La sal común, o cloruro sódico, es el condimento más usado en la fabricación de embutidos. España aventaja a los demás países por la excelente calidad de su sal. La sal, además de proporcionarle ese grato sabor que todos conocemos, ejerce también una ligera acción bactericida y facilita la absorción de agua, estableciéndose con ello, un estado coloidal conveniente.

Las sales de nitro: las más empleadas en la preparación de embutidos son: el nitrato sódico y el nitrato potásico.

En algunos países está autorizado el empleo del nitrito sódico para sustituir al nitrato sódico. El nitrito sódico tiene la ventaja sobre el nitrato de ser diez veces más eficaz. Su mejor aplicación es en la preparación de salmueras. La chacinería española lo utiliza poco.

Los condimentos vegetales más empleados son: especias, hierbas, bulbos aromáticos, esencias y especies esterilizadas.

Las especias: Tienen el inconveniente de ser caras y las verdaderas proceden de países lejanos, de ahí que su falsificación se haya impuesto, a tal punto de ser ahora un negocio rentable. Las especias más usadas son: el pimentón, que no es otra cosa que el pericardio y bayas del pimiento seco y pulverizado. El pimentón es tan importante en la industria salchichera española que una clasificación de embutidos está basada en la presencia o ausencia de esta especie.

Así tenemos que se llaman "embutidos blancos" a los que carecen de pimentón y "embutidos encarnados" a los que contienen pimentón. Otras especies utilizadas en esta industria son: la pimienta, el clavillo, la nuez moscada, la flor de macis, cardamomo (muy empleada en la preparación de mortadelas, salchichas de hígado, salami-italiano, etc.) jengibre, cilantro (empleada en la preparación de salchichas de lengua, morcillas, etc.) canela, anís, anís estrellado, comino (para embutidos cocidos) y alcaravéa.

Hierbas y Bulbos Aromáticos, se emplean principalmente la mejorana (para preparar morcillas, salchichas escaldadas y salchichas de hígado), orégano, tomillo, ajo y cebolla, (empleada para salchichitas de azar, salchichas de hígado y morcillas). Cuando la cebolla se usa cocida, conserva al embutido varios meses; y cuando se la usa cruda, exige una pronta consumición.

El azúcar, aquí en España no se usa en la preparación de embutidos. En otros países, se emplea para corregir la acción

deshidratante del nitró y para dulcificar el sabor amargo de las sales. El azúcar preferido para esta finalidad es la sacarosa de caña.

Especies Esterilizadas: HOFFMANN y EVAUS DE BACHMANN han demostrado que las especies llevan consigo una abundante y variada flora de bacteria. La presencia de estas bacterias hacen a los embutidos agentes de procesos toxiinfecciosos de diversa índole. Para evitar estos riesgos, se ha introducido la modalidad de esterilizar las especies, así, en los Estados Unidos y Alemania se ofrecen en el mercado especies ya esterilizadas. El proceso empleado con más frecuencia es la esterilización química con óxido de etileno. Este proceso de esterilización no afecta las cualidades aromáticas de las especies y estas conservan los mismos usos que la variedad sin esterilizar.

Líquidos: Para facilitar la formación de la pasta, se usan los siguientes líquidos: agua, vino, vinagre, líquidos alcohólicos y aceite de oliva.

El agua, se emplea generalmente en forma líquida para facilitar el amasado de la pasta. Es más conveniente usar agua fría, porque da mejor pasta. El agua fría tiene la doble ventaja de no calentar la carne y de incorporarse fácil e íntimamente a la pasta. En algunas ocasiones, como en la preparación de pasta para salchichas de escaldar, se emplea agua sólida o hielo, pero en la variedad de hielo cristal, finamente picado que se echa durante la fase de picado.

El vino, es utilizado por la industria salchichera española, francesa e italiana en la preparación de embutidos. Majar los ajos en vino es una costumbre casera en la que el vino sustituye al agua, y los resultados obtenidos son francamente buenos. Los vinos empleados son los vinos corrientes de mesa y los generosos.

El vinagre, realmente se emplea poco en la salchichería. Tiene su origen en la fermentación acética de los líquidos alcohólicos y sirve para conservar alimentos vegetales y en

curtidos. El mejor viragre es el viragre de vino o de sidra, aquel que tiene un contenido acético, de seis grados como mínimo.

Hay embutidos, en cuya receta entran líquidos fuertemente alcohólicos como: coñac, Kirsch, curacao, etc. En muchos adobos, entra también el aceite de oliva. El aceite aquí empleado, no debe tener sabor desagradable porque lo puede transmitir al embutido.

Colorantes: La legislación española, autoriza el empleo de colorantes sintéticos para la corrección de embutidos. Los colorantes autorizados son de la serie azoica, considerados inócuos, incluso después de mucho tiempo de ingestión. Con estos colorantes se trata de conseguir ese tono rojo natural que le da la hemoglobina a la carne fresca. El color rojo conseguido con el pimentón es muy fuerte. Los colorantes autorizados por la legislación española para ser añadidos a la pasta de carne son: Azorrubina, Amoranto, Eritrosina y Escarlata.

PREPARACION DE LOS EMBUTIDOS

Ya que es imposible describir en detalle la preparación de cada uno de los diferentes tipos de embutidos, revisaremos de manera general las condiciones de su preparación y los preceptos higiénicos indispensables. En la preparación de todos ellos existe una serie de fases aplicables a cualquiera de estas variedades.

Si bien es cierto que el éxito de un embutido depende de la bondad de sus materias primas, no es menos cierto que también influye y de forma decisiva, el cuidado y las atenciones que se preste a su elaboración. Hasta llegar al producto comercial, la carne y los condimentos son sometidos a toda una serie de preparaciones manuales unas y mecánicas otras, como son:

Preparación de la Pasta: Esta preparación consiste en picar la carne en tajadas muy menudas. Esta debe estar lo sufi-

cientemente fina para que pueda ser embutida en la tripa.

Cuando la pasta contiene sangre, se llama bodrio.

El picado consiste en reducir las carnes, vísceras, etc., a trocitos diminutos. El tamaño de estos guarda relación con el tipo de embutido que se quiera preparar. El picado en si es una operación sencilla y casi siempre lo realiza la máquina picadora. La graduación del picadillo la da el tipo de embutido que se desee preparar, así, los chorizos contienen trozos grandes de carne. El salchichón y la sobrasada, contienen trozos más pequeños pero aún visibles a simple vista. Las máquinas picadoras que son movidas a mano, pican hasta cincuenta kilogramos de carne por hora; las movidas por electricidad, pican entre ciento cincuenta y mil kilogramos de carne por hora. Estas máquinas, igual que todas las empleadas en esta industria, cumplen con los requisitos exigidos para este tipo de trabajo, como son, estar hechos con piezas desmontables fáciles de limpiar; cuchilla muy cortante, que corte y que no magulle la fibra muscular,

de fácil manejo y sin peligro para el manipulador.

Convertida de esta manera la carne en picadillo se le añaden los condimentos: sal, especias, líquidos, etc., que completan la formación de la pasta que ha de ser embutida. Luego estos componentes tienen que ser amasados. El trabajo de amasamiento de la pasta se puede hacer a mano, pero la industria actualmente utiliza máquinas amasadoras o mezcladoras, que realizan este trabajo en forma más rápida, segura, higiénica y económica. En la actualidad, se emplean máquinas amasadoras que trabajan al vacío. Con este sistema, se pretende evitar que la microflora del aire ambiente contamine el picadillo de carne.

Existen dos tipos de pastas. Una, la pasta blanda, que se emplea para preparar los embutidos de venta inmediata que requieren un consumo rápido; ejemplo de estos son las salchichas crudas. La otra, es una pasta dura, utilizada para preparar embutidos secos, que se mantienen más tiempo sin alte-

rarse, como el chorizo, salchichón, etc. La pasta blanda, apenas necesita reposo; en cambio, la pasta dura, requiere muchas horas de reposo. Es durante esta fase de reposo que se producen los fenómenos fermentativos tan necesarios para su preparación.

Se desconoce aún el mecanismo de la fermentación cárnica de los embutidos. Se sabe que la pasta además de carne y condimentos, contiene "microbios industriales", que son los que producen los cambios benéficos esperados. Para conseguir estas transformaciones microbianas, es necesario el reposo u oreo de las pastas. Esta etapa imprescindible, es a su vez peligrosa, ya que es una magnífica oportunidad para que los gérmenes ambientales, como el estafilococo, la contaminen.

Los microbios de la putrefacción no crean problemas, se aniquilan por si mismos; ellos solo pueden vivir en un medio alcalino y la carne por su propia naturaleza es ácida, y esta acidez se aumenta con la adición de sal. Concluidas

las horas de reposo u oreo, la pasta carnosa adquiere nuevos sabores que son los que agradan al consumidor. De ahí que los gérmenes acidificantes y acidófilos sean buenos amigos de los choriceros y salchicheros, ya que con sus fermentaciones, contribuyen a transformar la carne cruda, en un rico alimento llamado salchichón o chorizo.

Otra fase en la elaboración de estos alimentos es el "embutido". Este tiene por objeto introducir la pasta dentro de la tripa que le sirve a su vez de receptáculo y de protección. El empleo de tripa sana y carne sana, son las mejores garantías de buena calidad de un embutido. En la actualidad, la operación de embutir lo realiza la máquina embutidora; estas son rápidas, gradúan la pasta y la inyectan en la tripa a igual presión. Esto contribuye a dar al embutido una excelente presentación comercial.

Después de embutida la tripa, se atan sus extremos con bramante, que evita que la masa salga al exterior.

Concluidas todas estas operaciones, los embutidos duros como el salchichón, chorizos, etc., pasan a una estufa donde adquieren un color rojo atractivo, al mismo tiempo que aviva la flora bacteriana que contienen, estimulándola a que continúe su benéfica actividad fermentativa.

Protección: La manteca y el aceite son los mejores protectores mecánicos de los embutidos. Estos materiales grasos forman una capa aisladora entre la carne y la atmósfera ambiental, que les da amplia protección. El uso de papeles de estaño y celofán para proteger estos alimentos, se usan mucho para proteger salchichones y longanizas de alto precio. Sus resultados son buenos. La Legislación Sanitaria a este respecto, solo exige que el papel de estaño empleado para envolver sustancias alimenticias, no contenga más del uno por ciento de plomo y solo una centésima de arsénico. El inconveniente del papel de estaño, es que tapa u oculta el producto que protege.

Actualmente se emplea el vacío como medio aparentemente más seguro para evitar la contaminación microbiana del aire sobre los embutidos. Sin aire solo pueden vivir determinadas especies bacterianas, como son las anaeróbicas. El estafilococo es un anaeróbico facultativo, por lo tanto este germen sigue siendo un agente peligroso. Por otro lado los embutidos se conservan bien al vacío y con este sistema se consigue prolongar el período de conservación de estos alimentos.

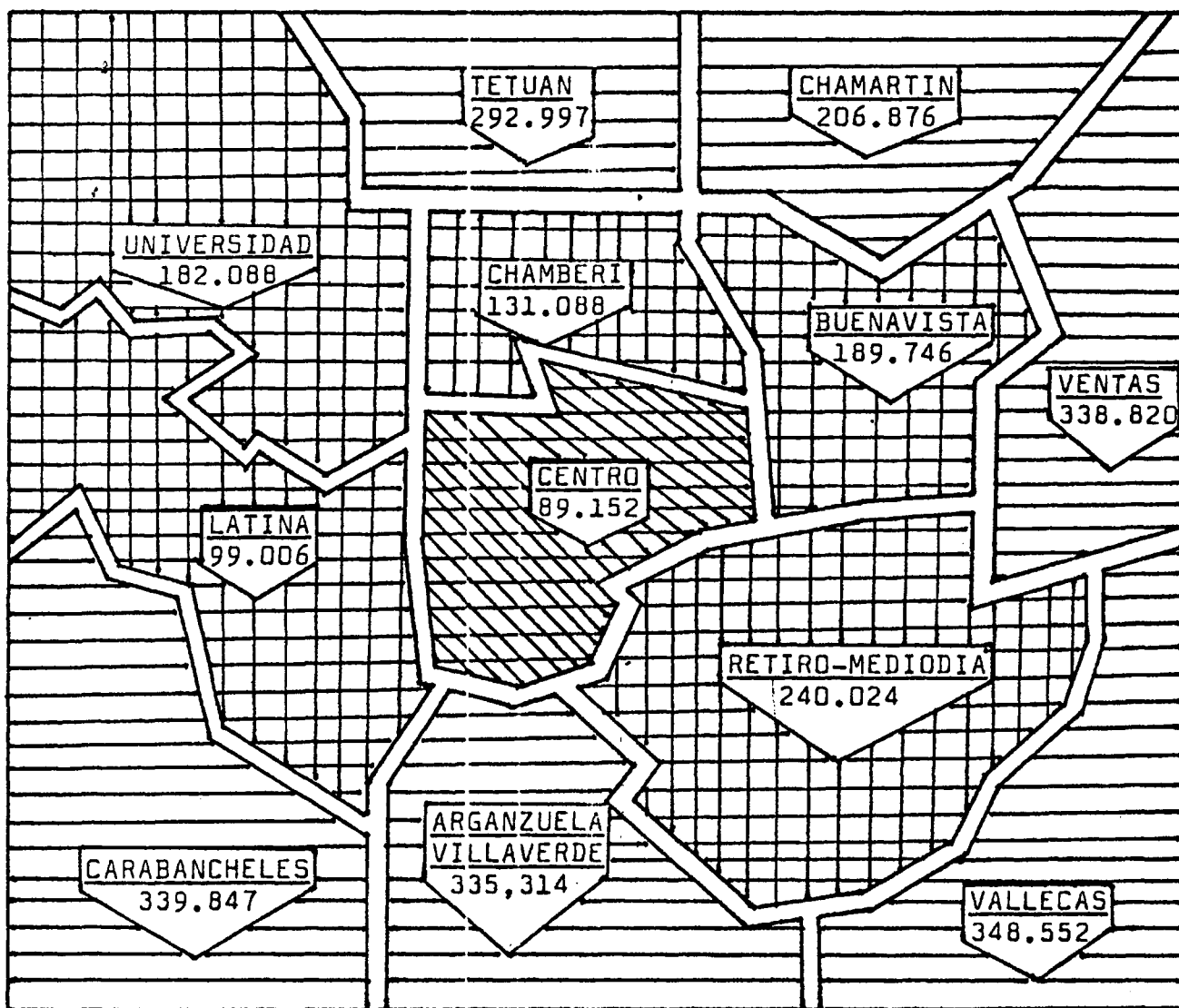
Revisada la pauta analítica empleada, las pruebas en animales de experimentación para estudiar la producción de enterotoxina, y resumidas de una manera sistemática la elaboración y el contenido del material objeto de nuestro estudio, trataremos de justificar nuestro trabajo resumiendo cuales han podido ser las fuentes de contaminación estafilocócica en las muestras infectadas:

1. La carne y demás productos empleados pueden estar contaminados porque el animal tuviera ya el estafilococo.

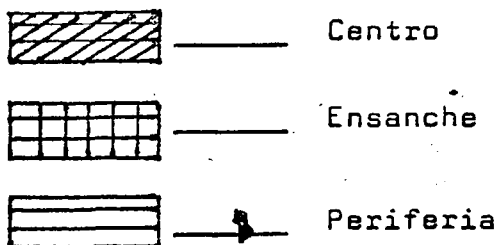
2. El personal que sacrifica los animales y manipula la carne para la preparación del embutido.
3. Los recipientes donde se hace la pasta y las maquinarias que se emplean para el picado.
4. Las tripas que se utilizan para embutir la pasta.
5. El agua que interviene en la preparación.

POBLACION DE LOS DISTINTOS DISTRITOS DE MADRID

SEGUN PADRON DE 1965



Datos oficiales facilitados por la seccion de estadistica del Ayuntamiento.



ESPECIFICACION DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS

Dentro de la gran variedad de preparados y embutidos cárnicos que existen en el mercado, hemos seleccionado los siguientes por considerarlos de mayor consumo.

Carne Picada:

Embutidos de Carne:	Salchichón
.....	Chorizo
.....	Salchichas Blancas y Rojas.
.....	Butifarra
.....	Sobrasada
Embutidos de Visceras:	Salchichas de Hígado
Embutidos de Sangre:	Morcillas
Fiambres:	Jamón York
.....	Mortadela

NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS POR DISTRITO

En cada uno de los doce distritos madrileños, hemos estudiado las siguientes variedades de preparados cárnicos:

Carne picada	8
Embutidos de carne	8
Embutidos de vísceras	8
Embutidos de sangre	8
Fiambres	8
<u>TOTAL:</u>	<u>40</u>

NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS EN TOTAL

En Madrid-Capital hemos estudiado en total el siguiente número de muestras:

Carne picada	96
Embutidos de carne	96
Embutidos de vísceras	96
Embutidos de sangre	96
Fiambres	96
<u>TOTAL:</u>	<u>480</u>

CANTIDAD DE ALIMENTO CONTENIDO EN CADA MUESTRA

75 GRAMOS

CANTIDAD Y TIPO DE ALIMENTO ESTUDIADO POR DISTRITO

Carne picada	600.	gramos
Embutidos de carne	600.	gramos
Embutidos de vísceras	600.	gramos
Embutidos de sangre	600.	gramos
Fiambres	600.	gramos

CANTIDAD DE ALIMENTO ESTUDIADO POR DISTRITO

3000 GRAMOS

CANTIDAD TOTAL DE LAS VARIEDADES ESTUDIADAS

Carne Picada	7.200	gramos
Chorizo	1.440	gramos
Salchichón	1.440	gramos
Salchichas	1.440	gramos
Butifarra	1.440	gramos
Sobrasada	1.440	gramos
Salchichas de Hígado	7.200	gramos
Morcillas	7.200	gramos
Jamón York	3.600	gramos
Mortadela	3.600	gramos
<u>TOTAL:</u>	36.000	gramos

CANTIDAD TOTAL DE ALIMENTOS ESTUDIADOS EN MADRID

36 KILOS

DATOS SOCIOLOGICOS DEL CONSUMO DE EMBUTIDOS Y CARNES

EN MADRID

El extraordinario volumen de población de Madrid y la relativamente escasa variedad de producción de las zonas que lo rodean, supone que su abastecimiento exige una amplia red de producción y transporte que es atendida en su mayor parte por la actividad económica privada.

La distribución de los mercados en Madrid es muy dispar, así vemos como en el anillo periférico de la capital estos son más escasos, aunque su población es mayor que el centro y ensanche.

La administración local prevé de mataderos y mercados centrales, que entre otras ventajas tienen, que permiten un control sanitario cómodo y seguro de sus artículos, dando lugar a inutilizaciones en las inspecciones bromatológicas periódicas.

Como ejemplo de lo que aquí citamos tenemos los informes de inspección y análisis químico de alimentos junto con el de inutilización de las especies alteradas y declaradas no aptas para el consumo, obtenidos directamente del Laboratorio Municipal de Higiene del Ayuntamiento de Madrid.



AYUNTAMIENTO DE MADRID

Laboratorio Municipal de Higiene

(RESUMEN DE LOS SERVICIOS REALIZADOS DESDE EL
DÍA 12 DE ENERO AL 31 DE JULIO DE 1.968.)

INSPECCION DE SUBSISTENCIAS

en los distintos establecimientos del ramo de la alimentación

ESTABLECIMIENTOS OBJETO DE LA INSPECCIÓN	INSPECCIÓN QUÍMICA		INSPECCIÓN VETERINARIA		TOTAL DE SERVICIOS REALIZADOS	TOTAL DE MUESTRAS RECOGIDAS	INUTILIZACIONES	
	Servicios realizados	Muestras recogidas	Servicios realizados	Muestras recogidas			Número	Cantidad
Despachos de leche.....	853	148	2211	2	3.064	150	5	
Establos.....			311		311			
Despachos de vinos y aguardientes.....	1.222	307			1.222	307		
Cafés y bares.....	345	96	1127	16	1.472	112		
Fondas, restaurantes y casas de comidas.....	132	10	284		416	10		
Tahonas y despachos de pan.....	477	94			477	94		
Pastelerías, confiterías y similares.....	317	47			317	47		
Fábricas de productos alimenticios.....	94	8	302		396	8		
Tiendas de comestibles.....	1.515	403	11923	1.172	13.438	1.575	320	
* Despachos de carne.....			17038	1.925	17.038	1.925	1218	
Pescaderías.....			14158	44	14.158	44	1419	
Despachos de aves, huevos y caza.....			9851	18	9.851	18	1113	
Despachos de frutas y verduras.....			20798	1	20.798	1	3027	
Puestos callejeros o mercadillos de la vía pública.....								
Otros establecimientos.....	1.551	2	1479	31	3.030	33	13	
TOTALES.....	6.506	1.115	79482	3.209	85.988	4,324	7121	=====



ANALISIS QUIMICO DE ALIMENTOS

NATURALEZA DE LAS MUESTRAS	Análisis especiales	Servicio público (1)	Inspección de subsistencias (2)	Requeridos por organismos oficiales	TOTAL DE SERVICIOS	CALIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS	
						Buenas o admisibles	Malas o no autorizadas
Vinos	4	3	296		303	235	68
Vermuts, sidras y cervezas	1			1	2		2
Vinagres	2		35		37	35	2
Alcohol, licores y aguardientes			1		1	1	
Jarabes y gaseosas		1	12		13	13	
Helados (y aprobación de sus fórmulas)			7		7	7	
Leches	51	9	196	4	260	225	35
Quesos	2	1	14		17	15	2
Otros derivados de la leche (mantequilla, youghourt, etc.)		1			1	1	
Harinas y pastas para sopa, flanes, etc.	4	3	37		44	37	7
Pan, pastas, bollos, etc.			122		122	96	26
Chocolates			59		59	59	
Turrón, mazapán, dulces y otros productos de confitería.	4	20	52	3	79	66	13
Especias (azafrán, pimentón, canela, etc.)	1	1	75		77	74	3
Cafés, tes y sus sucedáneos			2		2	2	
Aceites y grasas	6			54	60	50	10
Conservas vegetales		2	4		6	5	1
Pescados (frescos y en conserva)	1	7	285		293	262	31
* Carnes y productos cárnicos	1	11	126	1	139	95	44
Jamones		34	8	1	43	32	11
* Embutidos		4	3.205		3.209	2.619	590
Alimentos varios		10	98	2	110	105	5
TOTALES	77	107	4.634	66	4.884	4.034	850

(1) Determinando únicamente si el producto presentado para su análisis es o no apto para el consumo

(2) Muestras recogidas por el Laboratorio en los distintos establecimientos del ramo de la alimentación.



(RESULTADO DE LOS SERVICIOS REALIZADOS DESDE EL DIA
12 DE ENERO AL 31 DE JULIO DE 1.968).

Inutilización de especies alteradas, no aptas para el consumo

CLASIFICACIÓN POR ESPECIES DE LAS INUTILIZACIONES PRACTICADAS	EN MATADEROS Y MERCADO DE GANADOS	EN MERCADOS CENTRALES	EN INSPECCIONES SANITARIAS DE CONSUMOS	EN ESTABLECI- MIENTOS PÚBLICOS	TOTAL DE INUTILIZACIONES
Leche.....				14	14 litros.
Queso.....			26	34	60 kilogramos.
Otros productos lácteos.....				4	4 idem.
Conservas vegetales.....				197	197 idem.
Idem de pescado.....				544	544 idem.
CARNES FRESCAS... {	Reses mayores.....	316			316 reses.
	Idem menores.....	297			297 idem.
	Vísceras, fetos, cabezas, etc..	32.416			32.416 unidades.
	Kilogramos de carne.....	918		1.809	2.727 kilogramos.
Carnes congeladas.....				405	405 idem.
Idem saladas o preparadas.....				234	234 idem.
Jamones.....				159	159 idem.
* Embutidos.....			80	957	1.037 idem.
Pescados frescos.....		97.798		5.365	103.163 idem.
Mariscos.....		105.846	29	3.086	108.961 idem.
Huevos.....			1.176	6.282	7.458 unidades.
Aves.....		83	167	2.578	2.828 piezas.
Caza.....		212		326	538 idem.
Frutas.....		198.634	236	11.582	210.452 kilogramos.
Verduras.....		353.500		10.957	364.457 idem.
Patatas y otros tubérculos.....		8.221			8.221 idem.
Otros alimentos.....				22	22 Kilogramos.

Para un mejor estudio analítico de la muestra hemos agrupado esta por Distritos Municipales según su adquisición con lo que hemos podido estudiar el mismo volumen de cada variedad en todos ellos.

Por otro lado si suponemos que cada distrito representa o agrupa estamentos sociales o socio-económicos afines, cabe la posibilidad de su influencia en la calidad de los derivados cárnicos que son consumidos en los diferentes estratos sociales: mejor materia prima, más esmerada elaboración, mejores condiciones higiénico-sanitarias en su venta al público, etc., y la consecuente influencia en el porcentaje de las muestras contaminadas, susceptible de producir cuadros enterotóxicos al ser ingeridas sin la adecuada preparación.

POBLACION DE LAS LLAMADAS AREAS HISTORICAS DE MADRID:

CENTRO, ENSANCHE Y PERIFERIA. SEGUN PADRON DE 1965.

CENTRO 281.717

ENSANCHE 889.771

PERIFERIA 1.622.022

TOTAL:, 2.793.510

Fuente: Sección de Estadística del Ayuntamiento de Madrid.

Aquí podemos apreciar la diferencia de población que existe entre el Madrid-Exterior o Periferia y el Madrid-Interior, que comprende las áreas de Centro y Ensanche.

CONSUMO DE EMBUTIDOS Y CARNE EN LA COMIDA Y CENA SEGUN LOS

INGRESOS MENSUALES DE LA FAMILIA

<u>INGRESOS</u>	<u>EMBUTIDOS</u>	<u>CARNE</u>
Menos de 2.500 Ptas.	5%	45%
De 2.500 a 4.999 Ptas.	10%	47%
De 5.000 a 9.999 Ptas.	10%	66%
De 10.000 a 19.999 Ptas.	18%	85%
De más de 20.000 Ptas.	25%	82%

Considerando los ingresos mensuales de la familia vemos en el cuadro anterior que son las familias de más alto ingreso mensual las que más consumen embutidos.

CONSUMO DE EMBUTIDOS Y CARNE EN LA COMIDA Y EN LA CENA SEGUN

LA CLASE SOCIAL SUBJETIVA

<u>CLASE SOCIAL</u>	<u>EMBUTIDOS</u>	<u>CARNE</u>
Clase Pobre:	11%	35%
Clase Trabajadora:	9%	59%
Clase Media Baja:	11%	82%
Clase Media Alta y Alta	21%	87%

En este cuadro se emplea el término "clase social subjetiva" porque en su obtención se pidió a los entrevistados a que se incluyeran a si mismos en una de las cinco categorías mencionadas.

Como se puede ver, es la clase social alta y la media alta, las que más consumen embutidos y las que menos, la clase pobre y la trabajadora.

CONSUMO DE EMBUTIDOS Y CARNE EN LA COMIDA Y CENA EN LAS

AREAS MADRILEÑAS DE CENTRO, ENSANCHE

Y PERIFERIA

<u>AREAS</u>	<u>EMBUTIDOS</u>	<u>CARNE</u>
Centro	11%	77%
Ensanche	12%	69%
Periferia	11%	61%

Como vemos en el cuadro anterior, el área que más consume embutidos es el área llamado "ensanche". Esta es una área esencialmente residencial, comprende barrios como El Viso, El Plantío, Salamanca, etc. Es importante hacer notar que en esta área aún teniendo el más alto porcentaje de consumo, no encontramos ninguna muestra contaminada con estafilococos patógenos.

Todas las muestras que hemos encontrado contaminadas con estafilococos patógenos y enterotóxicos procedían de la llamada Area Periférica o Madrid-Exterior, que comprende los distritos de Carabanchel, Arganzuela-Villaverde, Vallecas, Ventas, Chamartín y Tetuán, en la que vive el 58 por ciento de la población madrileña. Pensamos que este fenómeno se debe o tiene relación con la estructura demográfica de esta área: su población está formada por gente joven, recién emigrada de sus pueblos de origen, gente sencilla, trabajadores manuales, aún no totalmente incorporados a la vida de una gran ciudad, que toman muy a la ligera las precauciones higiénico-sanitarias de los alimentos, cuando no las desconocen.

Es esta emigración joven que crece a ritmo acelerado, de ingresos reducidos la que contribuye a hacer más profunda la diferencia entre el Madrid-Interior, que comprende las áreas de Centro y Ensanche y el Madrid-Exterior o Periférico,

CLASIFICACION DE EMBUTIDOS, CHARCUTERIA Y FIAMBRES SEGUN
EL CODIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL

EMBUTIDOS DE CARNE

Chorizo

Embuchado

Salchichon

Salchichas

Salchichas tipo Francfort

Butifarra

Butifarron

Sobrasada

EMBUTIDOS DE VISCERAS

Sabadeñas

Longanizas Gallegas

Salchichas de Hígado

EMBUTIDOS DE SANGRE

Botagueñas

Morcillas

FIAMBRES

Jamón de York

Mortadela

Roulada

Galantinas

Pastas de Hígado

Chicharrones

Esta clasificación nos ha servido de pauta para la selección de las muestras de acuerdo con su aceptación en el consumo.

R E S U L T A D O S

A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

[illegible]

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE CHAMARTIN
FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

[illegible]

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE VENTAS

FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

[illegible]

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE VALLECAS
FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

[illegible]

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE ARGANZUELA

VILLAVERDE FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

Número de Muestras.	Crecimiento Mani-tol.	Variedad	Fermenta-ción Ma-nita.	Pro-du-ció Pig-mento	Hemo-li-sis.	Gela-tina sa.	Deso-xi rribo nu clea sa.	Coa-gu-lasa	Cre-ci-mien-to Telu-rita	Prue-ba sobre el Gato	Prue-ba sobre la Rana	Prue-ba sobre el Ra-tón
162	+	lbus	-	-	-	-	-	-	-			
163	+	Albus.	-	-	-	-	-	-	-			
164	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
165	+	Albus	-	-	-	+	-	-	-			
166	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
167	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
168	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
169	+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
170	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
171	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
172	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
173	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
174	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
175	+	Albus	-	-	-	+	-	-	-			
176	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
177	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
178	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
179	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
180	+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
181	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
182	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
183	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
184	+	Albus	-	-	-	+	-	-	-			
185	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
186	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
187	+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
188	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
189	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
190	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
191	+	Albus	-	-	-	+	-	-	-			
192	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
193	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
194	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
195	+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
196	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
197	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
198	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
199	+	Albus	-	-	-	-	-	-	-			
200	+	Albus	-	-	-	+	-	-	-			
201	+	ALBUS	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE CARABANCHEL

FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

ro	Creci mien to	Varie dad	Fer menta ción	Pro du cción	Hemo li sis.	Gela tina sa.	Deso xi rribo nu clea sa.	Coa gu lasa	Cre ci mien to	Prue ba sobre el Gato	Prue ba sobre la Rana	Prue ba sobre el Ra- tón
- s.	Mani- tol.		Ma- nita.	Pig mento					Telu rita			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	Albus	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	AUR.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE LA LATINA

FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

[illegible]

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE LA UNIVERSIDAD

FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

[illegible]

100

TRAIN

[illegible]

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE BUENAVISTA

FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

[illegible]

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE RETIRO-
MEDIODIA FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS.

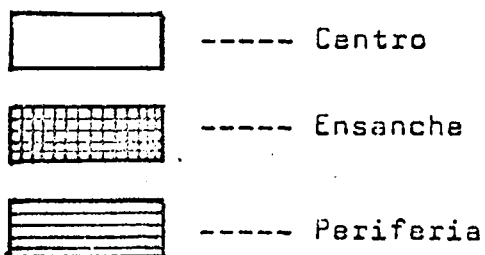
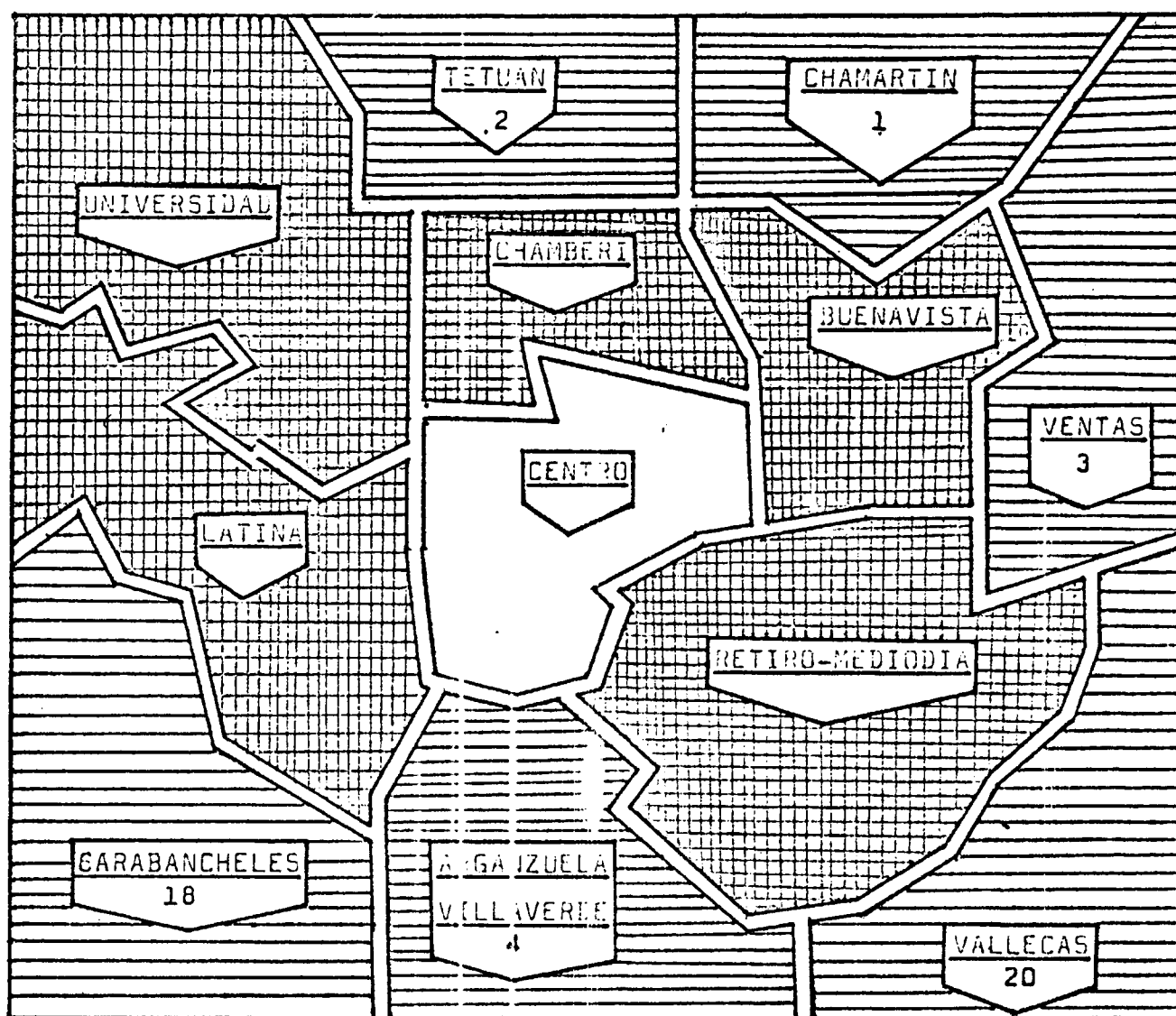
[illegible]

COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN EL DISTRITO DE EL CENTRO

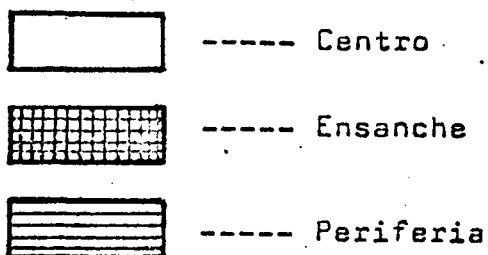
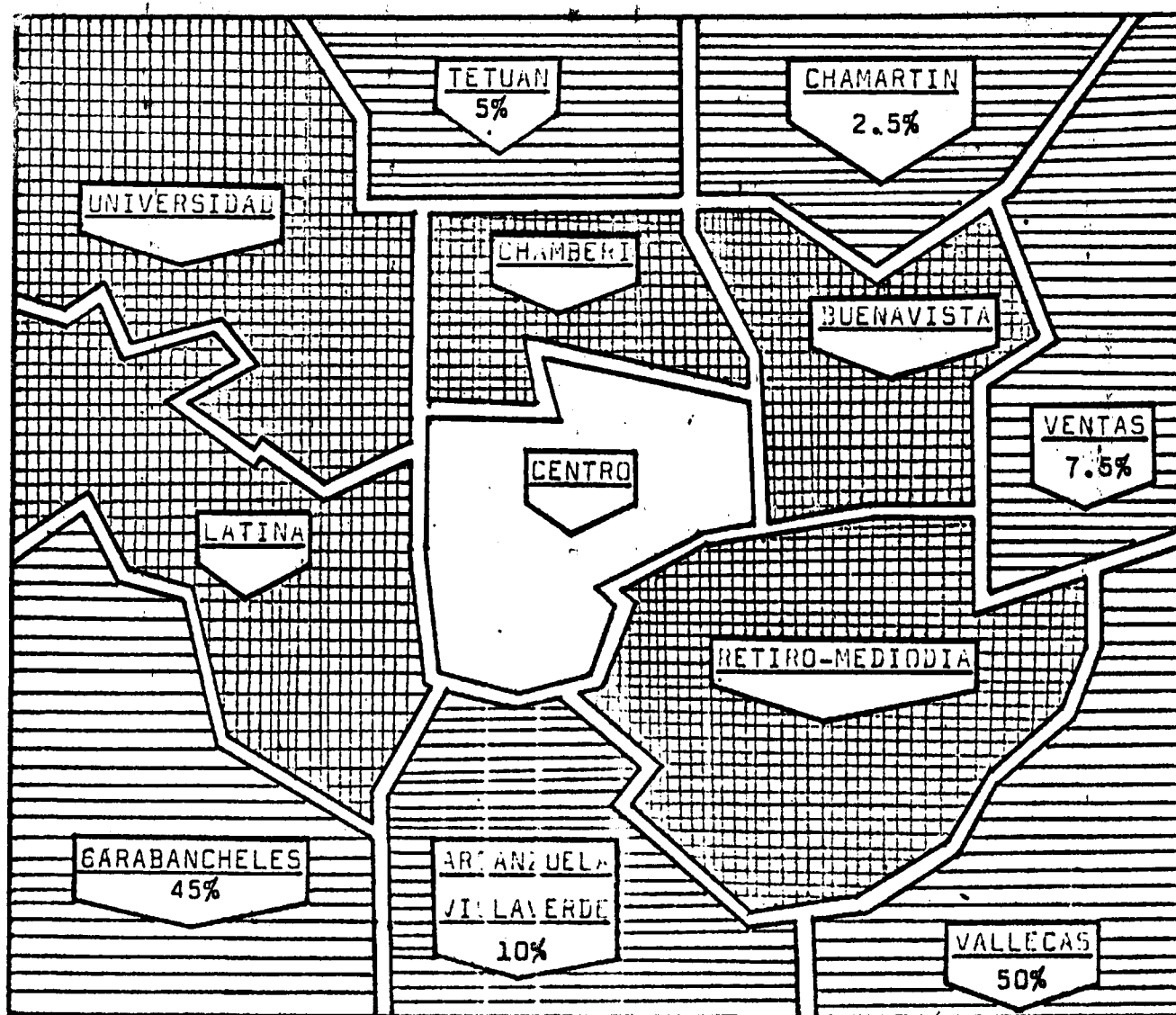
FRENTE A LAS DIFERENTES PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS

[illegible]

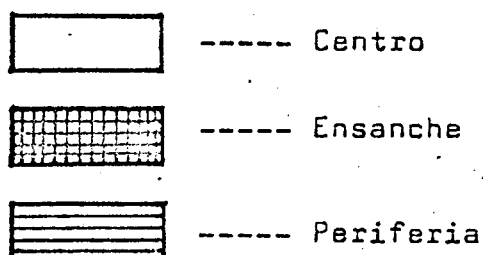
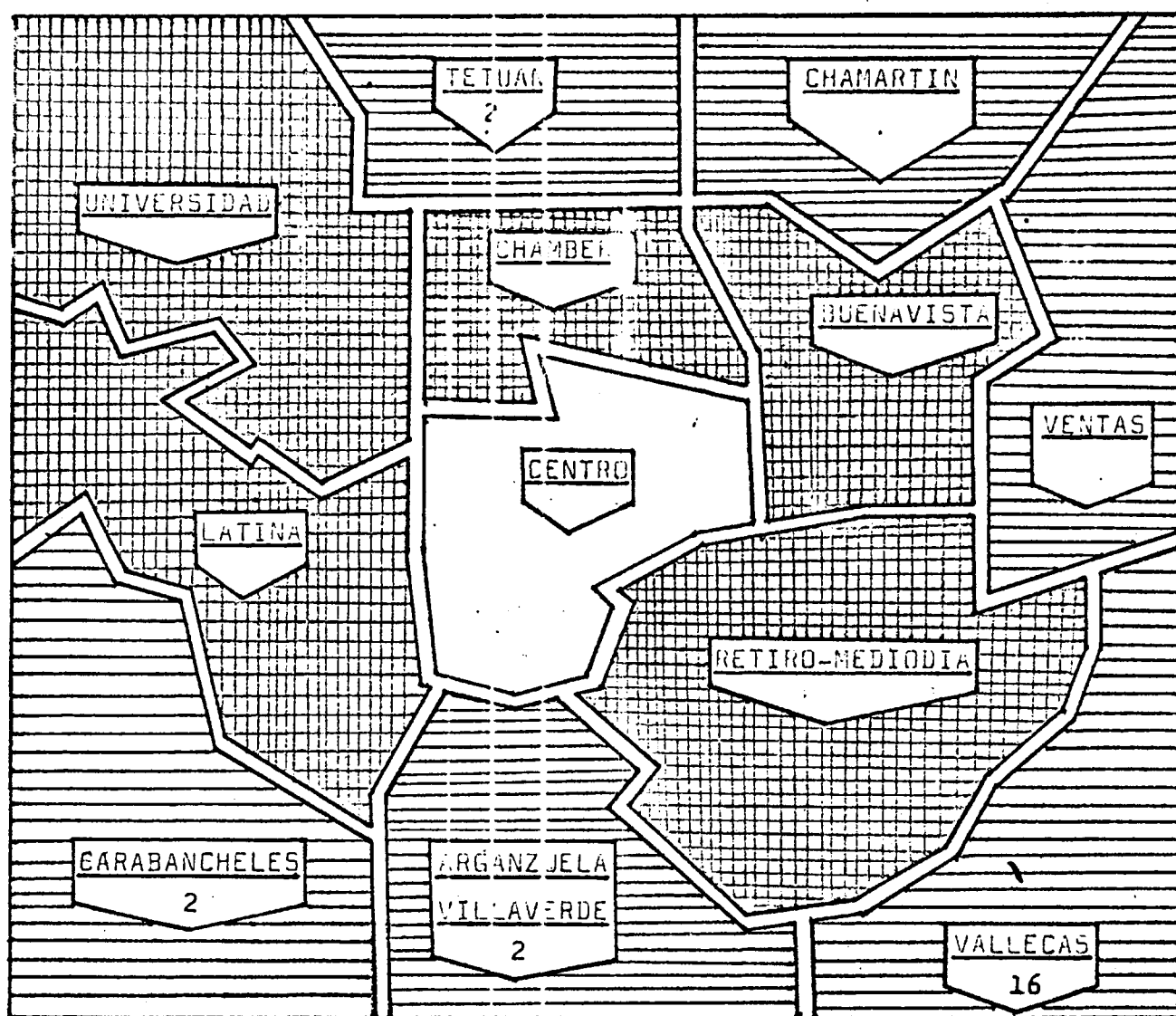
DISTRITOS DONDE FUERON ENCONTRADAS MUESTRAS CONTAMINADAS
CON ESTAFILOCOCOS PATOGENOS, DADAS EN NUMEROS ABSOLUTOS.



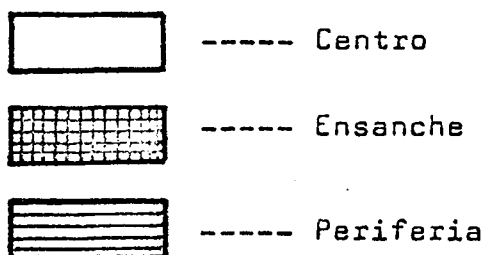
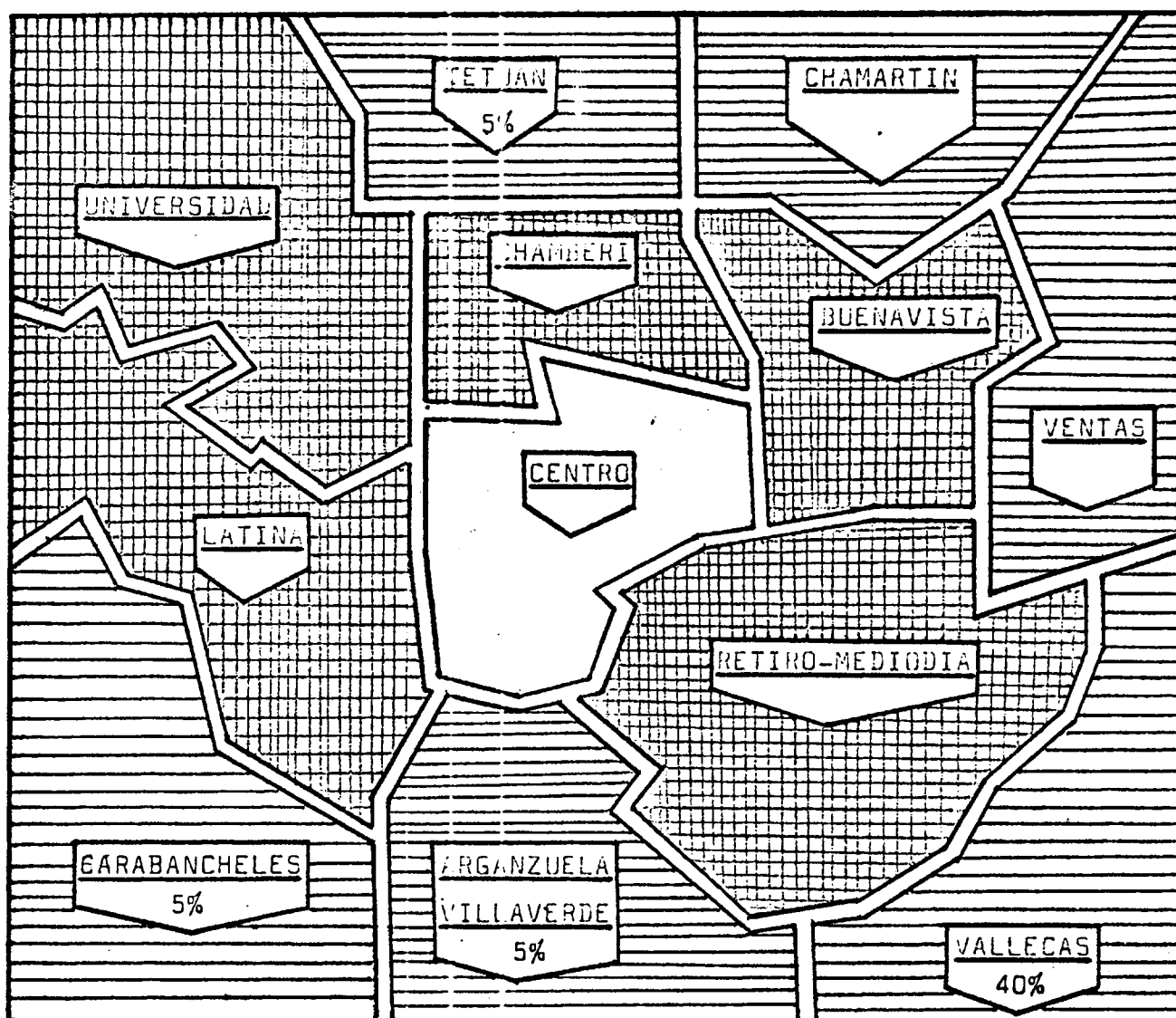
DISTRITOS DONDE FUERON ENCONTRADAS MUESTRAS CONTAMINADAS
CON ESTAFILOCOCCOS PATOGENOS, EXPRESADOS EN TANTO POR CIENTO
EN RELACION AL NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS EN CADA
DISTRITO.



DISTRITOS DONDE FUERON ENCONTRADAS MUESTRAS CONTAMINADAS
CON ESTAFILOCOCOS ENTEROTOXICOS, DADAS EN NUMEROS ABSOLUTOS.



DISTRITOS DONDE FUERON ENCONTRADAS MUESTRAS CONTAMINADAS
CON ESTAFILOCOCCOS ENTEROTOXICOS, DADAS EN TANTO POR CIENTO
EN RELACION CON EL NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS EN CADA
DISTRITO.



CANTIDADES ABSOLUTAS Y EN TANTO POR CIENTO DE ESTAFILOCOCOS NO PATOGENOS,
PATOGENOS Y ENTEROTOXICOS REFERIDOS A LA TOTALIDAD DE CADA MUESTRA

Clase de Muestra	Número de Muestras Analizadas	Con Estafilococos No Patógenos		Con Estafilococos Patógenos		Con Estafilococos Enterotoxicos	
		Cifras Absolutas	% Positivos	Cifras Absolutas	% Positivos	Cifras Absolutas	% Positivos
Carne Picada	96	96	100	25	26	17	17.7
Chorizo	20	20	100	0	0	0	0
Salchichón	19	19	100	0	0	0	0
Salchichas	19	19	100	17	89.4	5	26.3
Butifarra	19	19	100	0	0	0	0
Sobrasada	19	19	100	0	0	0	0
Sal de Hígado	96	96	100	0	0	0	0
Morcillas	96	96	100	0	0	0	0
Jamón de York	48	48	100	5	10.4	0	0
Mortadela	48	48	100	1	2	0	0

DISTRIBUCION DE LOS ESTAFILOCOCOS NO PATOGENOS, PATOGENOS Y ENTEROTOXICOS EN CANTIDADES ABSOLUTAS Y EN TANTO POR CIENTO DE CADA DISTRITO REFERIDO AL

NUMERO DE MUESTRAS

DISTRITOS	Número de Muestras Analizadas	Con Estafilococos No Patógenos		Con Estafilococos Patógenos		Con Estafilococos Enterotoxicos	
		Cifras Absolu tas	% Positi vos	Cifras Absolu tas	% Positi vos	Cifras Absolu tas	% Positi vos
Centro	40	40	100	0	0	0	0
Latina	40	40	100	0	0	0	0
Universidad	40	40	100	0	0	0	0
Chamberi	40	40	100	0	0	0	0
Tetuan	40	40	100	2	5	2	5
Chamartin	40	40	100	1	2.5	0	0
Ventas	40	40	100	3	7.5	0	0
Buenavista	40	40	100	0	0	0	0
Retiro-M.	40	40	100	0	0	0	0
Arganzuela-V.	40	40	100	4	10	2	5
Carabancheles	40	40	100	18	45	2	5
Vallecas	40	40	100	20	50	16	40

NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS SEGUN LOS LUGARES DE ADQUISICION,
POR DISTRITOS

DISTRITOS	Mer- ca- dos	Supe- Mer- ca- dos	Ultr mari- nos.	Sal chi- che rias	Embut dos. Fiam- bres.	Car- nes.	Mante- que- rias.	Auto servi- cio.	Lече rias. Mante- queri- as.	Repo- teri- as.
entro	1		4				1			2 8
niversidad	4	2				2		3	4	15
atina	3		2	2			1			8
etiro-M.	4		3		2		6			15
uenavista	3	3	3			1	3	2		15
hamberi	2		2				3		1	8
etuan	2		2				2			6
hamartin	3		5							8
entas	4		4							8
allecas	3		2							5
-Villaverde	2		3							5
rabancheles	4		5							9
	35	5	35	2	2	3	16	5	5	2 110

NÚMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS SEGUN LOS PREPARADOS CARNICOS Y
LUGARES DE ADQUISICION

LUGARES DE ADQUISICION	Carne Pica- da.	Chori zo.	Sal- chi- chón.	Sal- chi- chas.	Buti- farra	Sobra sada.	S.de Higa- do.	Mor- ci- llas.	Jamon de York.	Morta dela.	To ta
Mercados	96			6	5	5	35	35			18
upermercados		2	2	3	5	5	5	5	5	5	3
ltramarinos		5	5				35	35	35	35	15
alchicherias				6							
mbutidos y F.		3	3		4	4					1
arnicerias				4					3	3	1
antequerias		3	3			16	16				3
utoservicios							5	5			1
echerias y Man		5	4						5	5	19
eposterias		2	2		5	5					14
	96	20	19	19	19	19	96	96	48	48	48

CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se efectúa un trabajo de investigación del estafilococo patógeno y de su capacidad para producir enterotoxina sobre 480 muestras de alimentos cárnicos, principalmente carne picada, embutidos y fiambres de aquellos que se expenden directamente al público en los distintos establecimientos de Madrid-Capital.
2. Para un mejor estudio analítico de cada muestra, hemos procedido a recoger estas por Distritos Municipales, con lo que hemos podido estudiar el mismo volumen de cada variedad, en todos ellos. En cada uno de los 12 distritos en que administrativamente se encuentra dividida Madrid, hemos analizado 40 muestras. Cada muestra contenía 75 gramos de alimento aproximadamente.
3. Del número total de muestras analizadas en los 12 distritos, solo hemos podido detectar en 48 de ellas, estafilococos patógenos, lo que equivale a un 10 por cien

to del total. Estos fueron encontrados principalmente en el alimento llamado "Carne Picada" al que correspondió el 26 por ciento de casos positivos; seguidos, por los Embutidos de Carne, principalmente Salchichas de la variedad llamada "Madrileña Blanca y Roja", con el 17.7 por ciento. En los Fiambres, sobre todo en el Jamón de York y Mortadela, el porcentaje fué del 6.2 por ciento. En las muestras de Embutidos de Sangre y de Visceras, no hemos podido aislar ningún estafilococo patógeno.

4. De estas 48 muestras contaminadas con estafilococos patógenos, solo se comportaron como productoras de enterotoxinas 22, que corresponde al 45.83 por ciento de las muestras contaminadas con estafilococos patógenos y al 4.5 por ciento del total de muestras estudiadas. El 17.7 por ciento de los estafilococos enterotóxicos fueron aislados de las muestras de carne picada y al 5.2 por ciento en las Salchichas Madrileñas Blancas. Ninguno de estos alimentos presentaban alteraciones

organolépticas que los denunciasen como alterados.

5. La totalidad de las muestras contaminadas tanto con estafilococos patógenos como con estafilococos enterotóxicos, fueron adquiridas en lo que se ha dado en llamar el Madrid-Exterior o Periférico, que comprende los distritos de Carabanchel, Arganzuela-Villaverde, Vallecas, Ventas, Chamartín y Tetuán. En el llamado Madrid-Interior, que comprende los distritos de Centro, Universidad, Chamberí, Buenavista, Retiro-Mediodía y Latina, no encontramos ninguna muestra contaminada con estafilococo patógeno.
6. Todos los estafilococos encontrados en las muestras contaminadas eran de origen humano, según se demostró por la intensa y rápida actividad lítica de su hemolisina alfa contra los hematíes de conejo, a 37° C. Este hecho revaloriza la importancia de los manipuladores de alimentos.

7. La capacidad enterotóxica de estas cepas de estafilococos aisladas de estos alimentos, no significa forzosamente toxiinfección ya que todas ellas provenían de alimentos que fueron consumidos totalmente, sin que hayamos tenido noticias de brotes de toxiinfección.
8. Con nuestro trabajo hemos investigado, la capacidad que en potencia tienen los estafilococos enterotóxicos para producir toxiinfecciones, aunque como sabemos estas requieren un estado de sensibilidad muy particular, circunstancias ambientales propicias, más el hecho de que el 30 por ciento de los adultos, son resistentes a este tipo de intoxicación.
9. Los estafilococos con capacidad enterotóxica son en todo similar a los *Staphylococcus aureus* coagulasa-positivos, poseen propiedades bioquímicas comunes, producen las mismas enzimas y solo los diferencia su capacidad para elaborar enterotoxina.

10. De nuestra experiencia en el laboratorio podemos decir, que de igual valor que las pruebas clásicas de fermentación de la manita y la coagulación del plasma humano o de conejo citratado o heparinizado, son, la producción de desoxirribonucleasa y el crecimiento en presencia y la oxidación de la telurita, que en todos nuestros casos tuvieron igual comportamiento.
11. Sobre la pigmentogénesis tenemos que decir, que no encontramos ninguna variante blanca en los *Staphylococcus aureus*. La correlación entre la coagulasa y la producción de hemolisina fué total. En cuanto a la capacidad del estafilococo para licuar la gelatina, en nuestro trabajo 21 cepas blancas la licuaron con la misma rapidez que las amarillas.
12. Nuestro parecer sobre las pruebas biológicas realizadas con gatos, ranas y ratones para investigar la acción de la enterotoxina, es que estas siguen siendo poco prácticas. La inoculación a gatitos o Kitten-

Test, la hemos llevado a cabo siguiendo la técnica recomendada por DOLMAN, es decir, inoculando intraperitonealmente un filtrado de cultivo de estafilococos coagulasa-positivos, ya que la inoculación de extractos de alimentos es inespecífica. Creemos en su valor, sin menospreciar la odisea que supone conseguir el animal adecuado en el momento preciso y los pasos previos hasta obtener un filtrado libre de hemolisinas. En nuestros casos positivos, la reacción digestiva después de media hora de la inoculación fué tan violenta, que sus efectos nos recordaron de la opinión de MERCIER, "de que no se trata de una verdadera toxina, sino de un veneno convulsionante nacida del metabolismo microbiano".

13. Nos propusimos averiguar el grado de disparidad o falta de concordancia entre la "Prueba del Gatito" o Kitten-Test y la Prueba de la Rana; siguiendo la técnica aconsejada por ROBINSON Y MAIDA, empleamos la "rana esculenta". Pudimos comprobar que los 22 casos que fueron positivos

para el gato, lo fueron también para la rana, lo que nos demostró que su sensibilidad frente a la enterotoxina era igual, por lo menos en estos casos. Aceptamos como único signo de positividad la dilatación gástrica observada en la necropsia. No pudimos comprobar en ninguno de estos casos movimiento peristálticos de estómago, ni ningún fenómeno anormal en su conducta. Como hallazgo curioso y poco frecuente hemos encontrado en los 22 casos de producción de enterotoxina, una acentuada hiperpigmentación en las articulaciones medias de las extremidades posteriores de las ranas. Este hallazgo antes solo ha sido visto en Italia y continúa sin saberse a que atribuirlo.


14. La inoculación experimental a ratones con filtrados de cultivos de estafilococos coagulasa-positivos dieron siempre resultados negativos. La resistencia de estos animales a este tipo de infección queda así confirmada, una vez más, por la falta del cofactor plasmático o ac

tivador, presente solo en los animales sensibles.

15. La clorurofilia de los estafilococos patógenos nos ha servido de gran ayuda en la identificación de los gérmenes Gram-positivos. El uso de medios fuertemente sa lados inhibió de manera eficaz el crecimiento de los gérmenes Gram-negativos, haciendo fácil la identificación de los primeros.

16. Por lo anteriormente expuesto creemos en la necesidad de una campaña de educación sanitaria de carácter popu lar y general, que haga por ejemplo, en nuestro caso particular, que los manipuladores de alimentos tengan conciencia de los riesgos que su trabajo supone para su propia salud y la salud de la colectividad a la que sirven. A las amas de casa que sepan, que muchas de estas intoxicaciones se pueden evitar abreviando el tiem po que media entre sacrificio, compra y consumo de este tipo de alimento y con la refrigeración de estos en el hogar.

17. Aumentar la inquietud entre los responsables de estos problemas, para que se tenga más en cuenta la posibilidad de este tipo de intoxicación y no descartar erroneamente la etiología estafilocócica por no encontrar estafilococos en los vómitos y las heces de los afectados, cuando la verdadera causa de la intoxicación es la enterotoxina.

 18. Consideramos que han sido eficaces las disposiciones de las autoridades sanitarias creando: la implantación del carnet sanitario personal para los manipuladores de alimentos, la implantación de la cadena del frío para la carne y sus derivados en todos sus eslabones, centro productor, transporte y almacenes receptores, la inspección bromatológica periódica a los centros de producción y lugares de venta y la reciente legislación autorizando la venta de carne picada solo en saquitos de plástico cerrados al vacío y conservados en cámara frigorífica.
- 

19. La iniciativa privada también ha contribuido en este aspecto haciendo casi total la mecanización de la industria chacinera, usando especies esterilizadas en la preparación de los embutidos y produciendo el vacío en el cierre de los compuestos cárnicos enlatados, aunque esta precaución es de relativa eficacia para el estafilococo, dada su condición de anaerobio facultativo.
20. Pensamos que los embutidos por las condiciones intrínsecas de su preparación materias primas que contienen y por el número de manipulaciones a que son sometidos, deben ser alimentos tomados siempre en cuenta en la profilaxis de este tipo de toxiinfección.

BIBLIOGRAFIA

- Allison, V.D.: Discussion on food poisoning. Proc. Roy Soc. Med., 42:214-220, 1949.
- Anderson, Arnstein y Lester: Control de las enfermedades transmisibles, 1965.
- Anderson, E.S. and Hobbs, B.C.: "Food Poisoning". London, Royal Society of Health, 1962.
- Anderson, K.: The effect of staphylococcal filtrates on isolated rabbit small intestine, with special reference to enterotoxic strains of Staph. pyogenes. Brit. J. Exptl. Path., 34:548-555, 1953.
- Arbuthnott, J.P., Lominski, I., Scott, A.C.: Lancet, 590, 1962.
- Baird-Parker, A.C.J.: Gen Microbiol. 30:409, 1963.
- Baumgartner, J.G.: "Canned Foods An Introduction to their Microbiology". London, J. and A. Churchill Ltd., 1943.
- Bergdoll, M.S. y Kadavy, J.L., Surgalla, M.J. y Dack, G.M.: "Partial purification of staphylococcal enterotoxin", en Arch. Biochem. Biophys., 33, 259-262, 1951.
- : "The chemistry of staphylococcal enterotoxin", en Ann. N.Y. Acad. Sci., 65, 139-142, 1956.

—, y Lavin, B., Surgalla, M.J. y Dack, G.M.: "Chromatography in the purification of staphylococcal enterotoxin", en Science, 116, 633-634, 1952.

Blobel, H. y Berman, D.T.: Further studies on the in vivo activity of staphylocoagulase. J. Infect. Dis., 108: 63-67, 1961.

—, —, y Simon, J.: Purification of staphylococcal coagulase. J. Bact., 79:807-815, 1960.

Bravo Oliva, J.: "Actualidad Epidemiológica del Estafilococo." Lección de incorporación al Claustro. Salamanca, 1963.

—: "Intoxicaciones y toxiinfecciones alimenticias." Lección de Higiene y Sanidad, 1, 209-221, 1967.

Burrows, W.: Tratado de Microbiología. pág. 391, 1965.

Casado, Demetrio: "Estructura Social de la Alimentación Española", en Plan C.C.B., Madrid, Euramérica, 1965.

Casman, E.P.: Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. J. Bact., 79:849-856, 1960.

—: "Recent advances in the microbiology of foodborne diseases. Staphylococcal food poisoning." Comunicación

presentada a la reunión anual de la Am. Pub. Health
Assoc. San Francisco, California, 1966.

— , Bennett, R.W., Dorsey, A.E. and Issa, J.A.: Identifica-
tion of a Fourth Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin
D. J. Bact., 94/6 (1875-1882), 1967.

Dack, G.M.: Food Poisoning. University of Chicago Press,
3^a ed., 1956.

— : Food Poisoning. University of Chicago, Illinois,
109-154, 1957.

— : Food Poisoning. Chicago, The University Chicago
Press, 1962a. "Staphylococcal enterotoxin." Chemical
and biological hazards in food. Ames: Iowa State
University Press 1962b.

Diaz, R., Chordi, A., Tormo, F., y Rodriguez Burgos, A.:
"Producción de Pigmento por el Staphylococcus", Rev.
de Med. de la Univ. de Navarra, VIII:172, 1964.

Donnelly, C.B., Leslie, J.E., Black, L.A. and Lewis, K.H.:
Serological Identification of Enterotoxigenic Staphylo-
cocci From Cheese. Appl. Microbiol. 15/6 (1382-1387),
1967.

Duthie, E.S.: Variation in the antigenic composition of staphylococcal coagulase. J. Gen. Microbiol., 7:320-326, 1952.

— : The production of free staphylococcal coagulase. J. Gen. Microbiol., 10:437-444, 1954.

— : Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. J. Gen. Microbiol., 10:427-436, 1954.

— : The action of fibrinogen on certain pathogenic cocci. J. Gen. Microbiol., 13:383-393, 1955.

Ekstedt, R.D.: "The effect of coagulase on the antibacterial activity of normal human serum against selected strains of micrococcus pyogenes", in Ann. New York Acad. Sc., 65, 119, 1956.

— : Further studies on the antibacterial activity of human serum on Micrococcus pyogenes and its inhibition by coagulase. J. Bact. 72:157-161, 1956.

— : y Nungester, W.J.: Coagulase in reversing antibacterial activity of normal human serum on Micrococcus pyogenes. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 89:90-94, 1955.

Elek, S.D.: Staphylococcus Pyogenes and its Relations to Disease. Londres, Livingstone Ltd., 1959.

Evans, E.: Journal Bacteriology, 55:793: 1948.

— : y Niven, C.F. Jr.: A comparative study of known food-poisoning staphylococci and related varieties. J. Bact., 59:545-550, 1950.

Faber, V., Rosenthal, K. and Eriksen, K.R.: Brit. Med. J., 1960.

Fahlberg, W.J. y Marston, J.: Coagulase production by Staphylococcus Aureus. Factors affecting coagulase production. J. Infect. Dis., 106:111-115, 1960.

Fairbrother, R.W., y Southall, J.E.: "Mon. Bull. Min. Hlth. Pub. Hlth. Lab. Serv.", 9:170-172, 1950.

Fernandez Gómez, R.: "Inspección de Productos Cárnicos." Ponencia: Congreso de Alimentación y Nutrición, 1964.

Fernandez Pérez, F. Estafilococos: Bacteriología y Epidemiología. Estudio de Portadores. R. Veterinaria, XXXI (12), 1966.

FOESSA, Fundación: Informe Sociológico sobre la situación social de Madrid. Edit. Euro América, págs.23,127,156,1967.

Frarier, W.C.: Food Microbiology. New York, McGraw-Hill Book Co., 2nd edition, 1967.

Frobisher, M.: Fundamentals of Microbiology. W.B. Saunders, 8th edition, pages 414-569, 1968.

Gallego Capilla, J.: "Tres Episodios de Intoxicación Alimenticia por Enterotoxina Estafilocócica." Laboratorio, 501-512, 1960.

García Rodríguez, J.A.: Presencia de Estafilococos Patógenos Enterotóxicos en Alimentos Cárnicos y Lácteos de Primera Necesidad. Medicina Tropical, Nº 1, Tomo XLIV, pág. 99, 1968.

García Sánchez, G.: "Intoxicaciones Alimenticias por Estafilococos." Rev. San. Hig. Púb., 36:469-492, 1962.

Goldblith, S.A.: "Radiation sterilization of food." Nature, 210:433-434, 1966.

Gómez Lus, R.: Clasificación Serológica de los Estafilococos Patógenos. Su Importancia Epidemiológica. Comunicación presentada en la Real Academia de Medicina de Zaragoza, el 10 de febrero de 1966.

- Grov, A. and Rude, S.: Immunochemical Characterization of Staphylococcus Aureus Cell Walls. Sch. of Med. Univ. of Bergen.; Acta Path. Microbiol. Scand., 71:3 (409-416), 1967.
- Hall, H.E. y colaboradores: Publ. Health Rep., 12:1089-1098, 1963.
- Hallander, H.O. and Körlof, B.: Enterotoxin Producing Staphylococci. A Clinical Bacteriological Study on the Importance of Strains Isolated From Autopsies, Wounds and Burns. Acta Path. Microbiol. Scand., 71/3 (359-375), 1967.
- Harry, E.G.: The Characteristics of Staphylococcus Aureus Isolated from Cases of Staphylococcosis in Poultry. Houghton Poultry Res. Stat.; Res.; Vet. Sci. 8/4 (479-489), 1967.
- Hobbs, B.C.: Food Poisoning and Food Hygiene. London, Edward Arnold, 2nd edition, 1968.
- Jacherts, D.: Experimentelle Untersuchungen über die Identität freier und gebundener Coagulase. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr., 142:502-509, 1956.

Jacobs, S.I., Willis, A.T. y Goodburn, G.M.: J. Path.

Bacteriol., 87:151, 1964.

Jaulmes, C.H., Jude, A., Quezangal des Essarts, J. y Delga,

J.: Práctica de Laboratorio. Toray-Marron, primera edición, pág. 114, 1968.

Jones, O. and Jones, T.W.: "Canning Practice and Control".

London, Chapman and Hall Ltd., 1941.

Journal Milk and Food Tech., 13:226, 1950.

Kocur, M. and Mortensen, N.: Comparison of Methods for

Estimation of Anaerobic Production of Staphylococci and

Micrococci. Acta Path. Microbiol. Scand. 71:1 (141-146), 1967.

La Chapelle, N.C., Joy, E.H. y Halverson, C.W.: "A gastro-enteritis outbreak of Staphylococcus Aureus, type 29".

A.J.P.H., J.G.: 94, 1966.

Löfkvist, T., Öronklin, Las, Lund: Antigens in Staphylococcus

Aureus. An Immunological, Chemical and Biological Study

with Some Preparations of Purified Antigens. Berlingska Boktryckeriet, 1966.

MacCready, R.A. y cols.: New England J. Med. 256, 1121, 1957.

Marston, J. y Fahlberg, W.J.: Coagulase production by Staphylococcus Aureus. II. Growth and coagulase production in complex and chemically defined mediums - comparison of chemically defined mediums. J. Infect. Dis., 106: 116-122, 1960.

Martinez y Martinez, M.: "Toxiinfecciones Alimentarias.", Ponencia: Congreso de Alimentación y Nutrición, 1964.

Matilla, V., De La Lastra, J.M. y Diez, F.: Pruebas biológicas del género estafilococo para la diferenciación de razas patógenas y saprofitas. La Med. Trop., 5, 195-205, 1945.

— ; Pumarola, A. y Bravo, J.: Microbiología y Parasitología. Editorial Amaro, pág. 245, 1967.

Mellado Polo, A.: Estudio Microbiológico y Epidemiológico de los Gérmenes de la Familia Enterobacteriaceae, en los Productos Cárnicos. Revista Ibérica de Parasitología, Tomo XX, Pág. 345, 1960.

Moore, B.: "A New Screen Test and Selective Medium for the Rapid Detection of Epidemic Strains of Staphylococcus Aureus". Lancet, 2, 453-458, 1960.

Morris, E.L., Hodoval, L.F. and Beisel, W.R.: The Unusual Role of the Kidney During Intoxication of Monkeys by Intravenous Staphylococcal Enterotoxin B. U.S. Army Med. Unit, Fort Detrick, Frederick, Md. - J. Infect. Dis., 117/4 (273-284), 1967.

Noble, W.C., Valkenburg, H.A. and Wolters, C.H.L.: Carriage of Staphylococcus Aureus in Random Samples of a Normal Population. London, St. John's Hosp. for Dis. of the Skin - J. HYG. (Dond.) 65/4 (567-573), 1967.

Organización Mundial de la Salud: Reportes técnicos. Serie 184, 1959.

Ortiz Masllorens: Comparación de dos métodos para determinar la producción de coagulasa por los estafilococos. Clínica Española, Tomo XCI, Nº 5, 15 diciembre, 1963.

Palmer, E.D.: The morphologic consequences of acute exogenous (staphylococcic) gastroenteritis on the gastric mucosa. Gastroenterology, 19:462-475, 1951.

Peco Malagon, J.M.: "Estudio Microbiológico y Epidemiológico de Estafilococos Patógenos en Fosas Nasales." Lab. pág. 301, octubre, 1964.

Pedro Pons, A.: Patología y Clínica Médicas. Salvat, tomo VI, pág. 137, 1968.

Penna, R.: "Investigación Bacteriológica en los Extractos Alimenticios". Lab., 319-338, octubre 1965.

Piédrola Gil, G., Pumarola Busquets, A., Bravo Oliva, J. y Gonzalez Fuste, F.: "Higiene Medicina Preventiva y Social". Tomo I, pág. 210, 1967; tomo II, pág. 92, 1968.

Pillet, J. and Mercier, P.: Ann Inst. Pasteur, 78, 1950.

Primeras Jornadas Nacionales de Población: Alimentación de núcleos urbanos. Garantías para el abastecimiento. Sus condiciones higiénico-sanitarias. Madrid, mayo, 1966.

Rammelkamp, C.H., Jr. y Lebovitz, J.L.: The role of coagulase in staphylococcal infections. Ann. N.Y. Acad. Sci., 65:144-151, 1956.

Reparaz : Contribución al estudio epidemiológico del estafilococo. Microbiología Española, Vol. 18, Nº 1-2,

enero - junio, 1965.

Revenholt, R., Elkema, R., Muhern, M. y Watkins, R.:

"Staphylococcal infection in meat animals and meat workers". Publ. Hlth. Rep., 76, 879, 888; 1961.

Ricciardi, G. y Rizzo, G.; "Sobre dos episodios epidémicos de toxiinfección alimenticia por el estafilococo enterotóxico." Laboratorio, Año XXII N° 260, Agosto, 1967.

Rippon, J.E. and Asheshov, E.H.: J. gen. microbiol., 20: 634, 1959.

Rittmeyer, H.: Breve aportación sobre la presencia de estafilococos en la leche fresca embotellada. "Alimentaria", Año II, N° 5, enero, 1965.

Saiz Moreno, L.: "Intoxicaciones alimenticias provocadas por estafilococos." Red. Nac. de San., 681-683, 1955.

— : "Aportación al estudio de las intoxicaciones alimenticias por la endotoxina estafilocócica", en Rev. de San. e Hig. Pub., 32, 139-164, 1958.

— : "Intoxicaciones estafilocócicas por consumo de alimentos de origen animal", en Boletín Academia de Ciencias Veterinarias, 3, 24, julio, 1964.

- : "Mamitis Estafilocócicas, Importante Factor en el Control Sanitario de la Leche." Veterinaria, Tomo XXXI, Nº 11, noviembre, 1966.
- Sanz Egaña, C.: Enciclopedia de la Carne. Madrid, Espasa Calpe, págs. 573, 660, 1967.
- Sánchez Hernando : Conservación de Alimentos Mediante Radioisótopos. Revista de Sanidad e Higiene Pública, Julio - Sept., Num. 7-9, 1962.
- Sharf, J.M.: Recommended Methods for the Microbiological Examinations of Foods. Amer. Pub. Health Assn., New York, 2nd edition, 1966.
- Shemano, I., Hitchens, J.T. and Bailer, J.M.: Paradoxical Intestinal Inhibitory Effects of Staphylococcal Enterotoxin. Gastroenterology, 53/1 (71-77), 1967.
- Smith, D.D. y Johnstone, J.M.: Coagulase activity in vivo. Brit. J. Exptl. Path., 39:165-170, 1958.
- Smith, J.A. and Willis, A.T.: Some Physiological Characters of L Forms of Staphylococcus Aureus. Dept. of Microbiol., Monash Univ. Med. Sch., Melbourne - J. Path. Bact., 94:2 (359-365), 1967.

Smith y Conant: Bacteriología de Zinsser, pág. 441, 1960.

Stine, C.M., Walker, G.C. and Harmon, L.G.: J. Dairy Sci.,
44, 1961.

Stokes, J.L., Osborne, W.W. and Bayne, H.G.: "Food Research",
21,22, 1956.

Suarez Fernandez, G.: Enterotoxinas Estafilocócicas. Rev.
San. E. Hig. Pub., Tomo XLII, Pág. 47-48, 1968.

— : An. Fac. Vet. Leon, 12:11-166, 1966.

Sugiyama, H., Bergdoll, M.S. y Dack, G.M.: In vitro studies
on staphylococcal enterotoxin production. J. Bact., 80:
265-270, 1960.

Summers, M., Lynch, P.F. y Black, T.: El Pelo Humano como
Reservorio de Estafilococos. Liverpool, Laboratorio,
Pág. 537, 1964.

Tager, M.: Problems in the coagulation of plasma by
staphylocoagulase. Ann. N.Y. Acad. Sci., 65:109-118,
1956.

Tanner, F.W. and Tanner, L.P.: "Food-borne Infections and
Intoxications". Ganard Press, 1953.

Theieulin y Col.: "Consideraciones sobre los estafilococos de los productos cárnicos". Veterinaria, tomo XXIX, N° 3, Marzo, 1964.

Tirunarunakaran, M. and Lundbäck, H.: Relationship of pH Synthesis of Staphylococcal Toxins and Enzymes. Nat. Bacteriol. Lab., Stockholm - ACTA PATH. MICROBIOL. SCAND., 70:4 (637), 1967.

Tonetto, S.A.; Las toxiinfecciones Alimentarias, Veter., Milan, XV, 3, 1967.

Trans. N.Y. Academy Sciences, 9:52, 1946.

Valle, E.: "El Estafilococo y sus toxinas, causantes de Intoxicaciones alimenticias." Libro de Actas de la V Reunión Nacional de Sanitarios, Madrid, Págs. 447-450, 1959.

Vasallo Matilla, F.: El "Excherichia Coli" en el Intestino de los Roedores y su Interés Epidemiológico. Medicina Tropical, 1964.

Veron, E.: "Food poisoning in England and Wales, 1965", en Myh. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv., tomo 25, págs. 194-207, 1966.

Vivanco, F.: Alimentación y Nutrición. Madrid, Dirección General de Sanidad, 1963.

—, Palacios, J.M. y otros: "Observaciones sobre el estado nutritivo y situación alimentaria de un sector de la población madrileña. Revista Clínica Española, nums. 3,4 y 5, 1949.

Williams, J.D., Waltho, C.A., Ayliffe, G.A.J. and Lowbury, E.J.L.: Trials of Five Antibacterial Creams in the Control of Nasal Carriage of Staphylococcus Aureus. Lancet, 2/7512 (390-392), 1967.

Wilson, G.S., y Miles, A.A.: "Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity". Londres, Edward Arnold, 5ª edic., 1964.

Zebovitz: "Tellurite-Glycine Agar A Selective Plating Medium for the Quantitative Detection of Coagulase-Positive Staphylococci". J. Bacteriol., 70:686-690, 1955.